

格列卫对慢性粒细胞白血病人 Foxo3a 和 bcr-abl 融合基因表达影响

黄猛¹, 杨颀², 管洪在¹, 张玉娟¹, 吴春梅¹

(1 青岛大学医学院血液学教研室, 山东 青岛 266071; 2 青岛大学医学院附属医院血液病研究室)

[摘要] **目的** 探讨初发及格列卫治疗的慢性粒细胞白血病(CML)病人骨髓中转录因子 Foxo3a 和 bcr-abl 融合基因的表达及其临床意义。**方法** 采用 SYBR Green I 建立的实时荧光 RT-PCR 的方法, 检测 18 例初发及 10 例格列卫治疗的 CML 病人骨髓样本中 Foxo3a 和 bcr-abl 融合基因的表达, 以 GAPDH 为内参基因, 以行骨髓穿刺排除诊断的非血液病病人的骨髓为对照组; 各实验组基因表达水平的差异采用 $\Delta\Delta\text{CT}$ 相对定量法计算。**结果** 初发 CML 病人骨髓 bcr-abl 融合基因的表达水平与格列卫治疗组比较差异有显著性 ($\chi^2 = 4.25, P < 0.05$); 3 组骨髓样本中 Foxo3a 的表达水平比较差异均有显著性 ($\chi^2 = 5.73 \sim 13.73, P < 0.01$); 且初发 CML 病人的 bcr-abl 融合基因的高表达与转录因子 Foxo3a 的低表达呈明显负相关 ($r = -0.674, P < 0.01$)。**结论** 格列卫降低 CML 病人 bcr-abl 融合基因表达的同时可以增加 Foxo3a 的表达; 转录因子 Foxo3a 的低表达与 bcr-abl 融合基因的高表达密切相关, 二者可能共同参与 CML 的发生。

[关键词] 格列卫; 白血病, 髓样, 慢性; Foxo3a; bcr-abl; 融合基因; 逆转录聚合酶链反应

[中图分类号] R733.71 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-0341(2011)03-0203-04

THE INFLUENCE OF GLIVEC ON Foxo3a AND bcr-abl mRNA EXPRESSIONS IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOCYTIC LEUKEMIA HUANG MENG, YANG JIE, GUAN HONG-ZAI, ZHANG YU-JUAN, WU CHUN-MEI (Department of Hematology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expressions and their clinical significance of transcription factors Foxo3a and bcr-abl fusion gene in patients with initial chronic myelocytic leukemia (CML) and treated with Glivec. **Methods** Using real-time RT-PCR method created by SYBR Green I, 18 initial CML patients and 10 CML patients treated with Glivec were detected for the expressions of fusion gene of Foxo3a and bcr-abl; taking GAPDH as internal reference gene, those were excluded from the diagnosis of hematopathy, through bone marrow aspiration, were served as controls. The difference of gene expressions among the groups was analyzed by $\Delta\Delta\text{CT}$ relative quantity means. **Results** The difference of expression of bcr-abl mRNA was significant in initial CML patients versus those in Glivec-treated group ($\chi^2 = 4.25, P < 0.05$). The difference of expressions of Foxo3a mRNA in bone marrow samples of the three groups was significant ($\chi^2 = 5.73 \sim 13.73, P < 0.01$); In initial CML, over expression of bcr-abl fusion gene was negatively correlated with low expression of Foxo3a ($r = -0.674, P < 0.01$). **Conclusion** Glivec decreases the expression of bcr-abl mRNA in CML, and, simultaneously, increases the expression of Foxo3a; the low expression of Foxo3a is closely associated with the over expression of bcr-abl, both of them are likely to be involved in the genesis of this condition.

[KEY WORDS] Glivec; leukemia, myeloid, chronic; Foxo3a; bcr-abl; fusion gene; reverse transcriptase polymerase chain reaction

慢性粒细胞白血病(CML)是一种起源于多能造血干细胞的恶性增殖性疾病。其特征性分子标志 bcr-abl 融合基因编码具有异常酪氨酸激酶活性的 bcr-abl 融合蛋白, 导致 CML 的发生; Foxo3a 是转录因子 FOX 蛋白家族的成员, 作为酪氨酸激酶信号传导通路上的重要效应器, 参与细胞凋亡和细胞周期进程的调节; 格列卫是一种高度特异酪氨酸激酶抑制剂, 能有效地选择性抑制 bcr-abl 融合蛋白的酪氨酸激酶活性, 从而治疗 CML。本研究采用实时荧光 RT-PCR 方法检测了 CML 病人转录因子

Foxo3a 和 bcr-abl 融合基因的表达水平, 并探讨格列卫对 CML 病人转录因子 Foxo3a 和 bcr-abl 融合基因表达的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 18 例 ph 染色体阳性的初诊 CML 病人作为初发组(男 11 例, 女 7 例), 10 例格列卫治疗 2~36 个月后 ph 染色体转阴的 CML 病人作为格列卫治疗组; 28 例病人年龄 24~56 岁, 平均 43.7 岁; 全部为来自青岛大学医学院附属医院就诊的病人, 诊断及疗效标准见文献[1]。对照组为骨髓穿刺排除诊断的非血液病病人。

【收稿日期】2010-08-13, 【修订日期】2010-10-21

【作者简介】黄猛(1984-), 男, 在读硕士研究生。

【通讯作者】吴春梅(1966-), 女, 硕士, 副教授, 硕士生导师。

1.2 试剂与仪器

Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司产品), First Strand cDNA Synthesis Kit(美国 Fermentas 公司产品), SYBR Green Realtime PCR Master Mix(日本 TOYOBO 公司), Lightcycler 480 II PCR 仪(瑞士 Roche 公司), Eppendorf Biophotometer 核酸检测仪(德国 Eppendorf 公司)。

1.3 RNA 提取

无菌操作条件下取肝素抗凝的骨髓液 2 mL, 用淋巴细胞分离液分离出单个核细胞, 加入 Trizol 试剂 1 mL 混匀, 然后按 Invitrogen 公司试剂盒说明书进行细胞总 RNA 提取; Eppendorf Biophotometer 核酸检测仪测定 RNA 纯度($A_{260}/A_{280} > 1.60$) 和 RNA 浓度。

1.4 实时 RT-PCR 检测

1.4.1 引物设计 bcr-abl 融合基因的引物根据 GenBank 提供的 mRNA 序列(bcr: NM_004327.3; abl: NM_005157.3) 设计; 上游引物为 5'-CTCCA-GACTGTCCACAGCATTCCG-3', 下游引物为 5'-AAGGTGGAGGAGTGGGTGTTCG-3', 其扩增产物长度为 165/90 bp。Foxo3a 和 GAPDH 引物由上海生工生物工程公司设计; Foxo3a 上游引物为 5'-GCACCAATTCTAACGCCAGCAC-3', 下游引物为 5'-ATCCAGCAGGTCGTCCATGAGG-3', 其扩增产物的长度为 242 bp; GAPDH 上游引物为 5'-ATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3', 下游引物为 5'-AAGGTGGAGGAGTGGGTGTTCG-3', 扩增产物长度为 113 bp。3 对引物均经 BLAST 比对证实其特异性, 并由上海生工生物工程公司合成。

1.4.2 cDNA 合成 按 First Strand cDNA Synthesis Kit 的说明书操作; 取 5 μ g 的 RNA, Oligo(dT)18 primer 1 μ L, 用 DEPC 处理水补至 12 μ L, 70 $^{\circ}$ C 孵育 5 min。冰上骤冷后, 加 5 \times buffer 4 μ L, 20 \times 10⁶ U/L RNasin 1 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, 轻轻混匀、离心, 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min; 再加入 200 \times 10⁶ U/L 的 M-MuLV 1 μ L, 总体积为 20 μ L, 然后 42 $^{\circ}$ C 反应 60 min, 70 $^{\circ}$ C 反应 10 min。

1.4.3 实时荧光 RT-PCR 实时 RT-PCR 体系为 20 μ L, 其中双蒸水 6.4 μ L, SYBR Green Realtime PCR Master Mix 10 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L) 各 0.8 μ L, 逆转录产物 2 μ L。内参与目的基因分开扩增, 反应条件均为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 时采集荧光信号; 然后进行熔解曲线分析, 由 60 $^{\circ}$ C

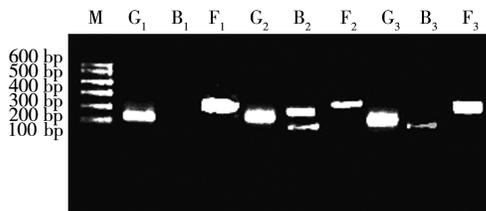
以 0.22 $^{\circ}$ C/s 上升至 95 $^{\circ}$ C; 最后冷却至 37 $^{\circ}$ C。

1.4.4 标准曲线的制作 将逆转录 CML 和对照组病人的 cDNA 先用 TE 稀释成 10 mg/L 作为标准品, 然后以 TE 做 10 倍系列稀释, 分别进行 GAPDH、Foxo3a 及 bcr-abl 实时扩增, 制作各自的标准曲线。

1.4.5 PCR 产物分析 取 PCR 产物 8 μ L, 在 15 g/L 的琼脂糖凝胶中电泳(80 V 电泳 25 min) 后, 在 113、165/90 和 242 bp 处各有一条亮带, 分别为 GAPDH、bcr-abl 和 Foxo3a(图 1)。实时荧光 PCR 显示, bcr-abl、Foxo3a 及 GAPDH 的扩增曲线形态良好, 阴性对照(以双蒸水代替模板)均无引物二聚体扩增产物。熔解曲线分析显示各基因均有单一熔解峰, 阴性对照无非特异性峰。

1.4.6 染色体核型分析 取骨髓采用 24 h 短期培养法, R 显带技术进行核型分析。

1.4.7 统计学方法 各组标本基因表达差异采用 $\Delta\Delta$ CT 相对定量法^[2], 差异水平用 $2^{-\Delta\Delta$ CT 表示, 以计算初发组和格列卫治疗组样本 bcr-abl 基因表达差异为例, 分别获得初发组和格列卫治疗组样本 bcr-abl 基因和参照基因 GAPDH 的 CT 值, 用格列卫治疗组样本 bcr-abl 基因 CT 均值减去格列卫治疗组参照基因 CT 均值, 得到 Δ CT (1), 同样, 用初发组样本 bcr-abl 基因 CT 均值减去初发组参照基因 GAPDH 的 CT 均值, 得到 Δ CT (2), 然后用 Δ CT (1) 减去 Δ CT (2), 得到 $\Delta\Delta$ CT, 格列卫治疗组样本 bcr-abl 基因相对于初发组样本 bcr-abl 基因的量通过公式 $2^{-\Delta\Delta$ CT 计算得到; 最后通过 2^{-CT} 将每一个标本的 CT 值进行转化后, 采用 SPSS 11.0 统计软件分析处理数据。



M: Marker; G₁、B₁、F₁ 分别为 1 例对照组标本的 GAPDH、bcr-abl、Foxo3a; G₂、B₂、F₂ 分别为 1 例初发组病人表达的 GAPDH、bcr-abl、Foxo3a; G₃、B₃、F₃ 分别为 1 例格列卫治疗组病人表达的 GAPDH、bcr-abl、Foxo3a。

图 1 GAPDH、bcr-abl、Foxo3a 在 CML 中的表达

2 结果

2.1 Foxo3a 和 bcr-abl 在初发组与格列卫治疗组 CML 病人中的表达

初发 CML 病人骨髓 bcr-abl 融合基因的表达水平与格列卫治疗组比较差异有显著性($\chi^2=4.25, P<0.05$)。见表 1。对照组、初发组和格列卫治疗组骨髓样本中 Foxo3a 的表达水平比较,差异均有显著性($\chi^2=5.73\sim 13.73, P<0.01$)。见表 2。

2.2 Foxo3a 与 bcr-abl 表达的相关性

Spearman 相关分析结果显示,初发组 CML 病人 Foxo3a 与 bcr-abl 表达水平之间呈明显负相关($r=-0.674, P<0.01$)。

表 1 CML 初发组与格列卫治疗组病人标本 GAPDH 与 bcr-abl 均值 CT 比较

组别	n	GAPDH CT	bcr-abl CT	$\Delta CT(1)$	$\Delta CT(2)$	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
初发组	18	19.05	25.28	6.23	—	—	7.46
格列卫治疗组	10	21.98	31.11	—	9.13	2.90	—

表 2 各组病人标本 GAPDH 与 Foxo3a 均值 CT 比较

组别	n	GAPDH CT	Foxo3a CT	$\Delta CT(1)$	$\Delta CT(2)$	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
对照组	10	23.28	27.69	4.41	—	—	—
初发组	18	19.05	28.17	—	9.12	4.71	26.17
格列卫治疗组	10	21.98	29.31	—	7.33	2.92	7.57

3 讨论

9 号染色体上 c-abl 原癌基因和位于 22 号染色体上 bcr 基因重排形成的 bcr-abl 融合基因是导致 CML 发生的主要因素,其编码具有异常酪氨酸激酶活性的 bcr-abl 融合蛋白,可通过激活 PI-3K/Akt、Ras-MAPK、PI3K-Akt、JAK2-STAT5 和 NF- κ B 等信号途径使 CML 白血病细胞不断增殖及凋亡减少^[3]。有研究显示,Foxo3a 是叉头(forkhead) 转录因子家族一员,最初发现它是在线虫中起调节长寿、代谢和生殖作用的 DAF-16 的同源基因。在 bcr-abl⁺ 细胞中转录因子 Foxo3a 是 PI-3K/Akt 信号途径下游的效应器。bcr-abl 融合蛋白通过激活 PI-3K/Akt 信号途径使 Foxo3a 磷酸化,抑制 Foxo3a 的表达。受到抑制的 Foxo3a,下调 Bim、TRAIL 和 FasL 等凋亡基因和非特异性周期依赖性激酶抑制因子 p27kip1 基因及 Cyclin D2 等细胞周期调节蛋白基因的表达,从而使 bcr-abl⁺ 细胞凋亡减少或阻滞于细胞周期 G₀/G₁ 期^[4-5]。本实验结果显示,18 例初发 CML 病人都不同程度地表达 bcr-abl 融合基因和转录因子 Foxo3a,但后者的表达水平与对照组相比明显降低,仅为对照组的 3.82%。且 Foxo3a 的低表达与 bcr-abl 融合基因的高表达呈负相关性($P<0.01$),表明 Foxo3a 可能通过 bcr-abl 融合蛋

白-PI-3K/Akt 信号途径参与 CML 的发生^[6]。

格列卫是一种能特异抑制 c-abl、bcr-abl 的酪氨酸激酶抑制剂,可使 CML 病人获得完全或部分血液学和细胞遗传学缓解。本实验结果显示,服用格列卫治疗后,ph 染色体虽已经转阴的 10 例 CML 病人,但通过实时荧光 RT-PCR 仍能检测到 bcr-abl mRNA,表明 RT-PCR 技术可更有效地监测 bcr-abl mRNA 的水平及病情变化^[7]。ESSAFI 等^[5] 研究显示,格列卫可以使磷酸化的 Foxo3a 去磷酸化而恢复活性,从而上调 Foxo3a 在 bcr-abl⁺ 细胞中的表达水平。本实验中,格列卫治疗组病人的骨髓 Foxo3a mRNA 的水平较初发组升高 3.46 倍,与文献报道的结果相符^[8]。CML 病人中转录因子 Foxo3a 的低表达与 bcr-abl 融合基因的高表达呈负相关关系,说明 Foxo3a 的活化可能抑制 CML 的发生和发展。KIKUCHI 等^[8] 研究显示,Foxo3a 的活性被重新激活后,可以使耐格列卫的 bcr-abl⁺ 细胞发生凋亡,因此研究 Foxo3a 活性的重新激活可能为 CML 治疗提供一条新途径。

【参考文献】

- [1] 张之南,沈悝. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007:134-138.
- [2] KENNETH J, LIVAK, THOMAS D, et al. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [3] GESBERT F, SELLERS W R, SIGNORETTI S, et al. bcr-abl regulates expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through the phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway[J]. *Biol Chem*, 2000, 275(50):39223-39230.
- [4] ZAINAB J, AMRIK S, KHOSRAVI R, et al. Foxo tumor suppressors and bcr-abl-induced leukemia: a matter of evasion of apoptosis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1785(1):63-84.
- [5] ESSAFI A, FERNANDEZ DE M S, HASSEN Y A, et al. Direct transcriptional regulation of Bim by Foxo3a mediates STI571-induced apoptosis in bcr-abl-expressing cells[J]. *Oncogene*, 2005, 24(14):2317-2329.
- [6] JOHANSSON B, FIORETOS T, MITELMAN F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia [J]. *Acta Haematol*, 2002, 107(2):76-94.
- [7] 李萍,管洪在,杨颖,等. 格列卫对慢性粒细胞白血病病人 Ph 染色体和 bcr-abl 融合基因表达影响[J]. *齐鲁医学杂志*, 2009, 24(4):289-291, 294.
- [8] KIKUCHI S, NAGAI T, KUNBITAMA M, et al. Active FOXO1g becomes Akt-inhibitor resistance in chronic myelogenous leukemia-derived cell lines via the production of tumor necrosis factor-related

能。XIAP 是 IAP 家族最有效、最有潜力的 caspase 抑制物, 可通过 N-端的 3 个 BIR 结构域直接结合并抑制 caspase-3、caspase-7 和 caspase-9 活性^[1], 同时 XIAP 还可通过激活 NF- κ B、参与受体介导的信号转导途径、细胞周期的调节以及铜代谢的调节等发挥抗细胞凋亡的作用。

近年来研究显示, XIAP 存在于许多物种中, 广泛表达于除外周血淋巴细胞外的所有成人、婴幼儿和胚胎组织中, 在人类多种恶性肿瘤, 如白血病、子宫颈癌以及肾癌等肿瘤组织中表达水平均高于正常组织^[7], 其表达水平与肿瘤的分化程度及预后有关。TAMM 等^[8]对包括中枢神经、肝、肺、肾、血液等 60 种人类恶性肿瘤细胞系的研究表明, XIAP 在多种肿瘤细胞系中均高表达。SHRIKHANDE 等^[9]研究显示, XIAP 在一些肿瘤耐药细胞系的表达水平高于亲代细胞, 提示 XIAP 过度表达在肿瘤的发生与耐药中具有重要作用。CARTER 等^[10]通过免疫印迹分析白血病细胞株发现, 多种白血病细胞系均表达不同水平的 XIAP, 还发现抗癌药阿霉素、泰素和长春新碱能降低髓系白血病 XIAP 的蛋白水平并降低细胞成活率。美国国家癌症研究中心对 78 例 AML 进行研究, 结果显示 XIAP 表达水平与病人生存期呈负相关, XIAP 低表达者完全缓解率与生存期明显高于高表达者^[9]。

本研究结果显示, 所有的 AL 病人均表达不同水平的 XIAP, 而且其表达水平明显高于对照组。AL 病人各阶段 XIAP 平均表达水平明显不同, 其中缓解组明显低于初治组和复发组, 而复发组表达水平最高, 说明 XIAP 在白血病细胞增殖分化中发挥重要作用, XIAP 可以作为白血病早期诊断、复发及预后评估的客观指标之一。XIAP 的表达水平在 AL 缓解期也高于对照组, 可能与微小残留白血病有关。复发组病人 XIAP 平均表达水平明显高于初治组, 提示 XIAP 的高表达有利于细胞逃离生长监控, 促进细胞异常增殖, 促进 AL 病情的进展, 因此 XIAP 表达水平的动态监测可以作为 AL 病人缓解期随访的观察指标, 以便早期发现复发病例, 早期治疗。但复发组的病人例数较少, 还有待于进一步扩

大病例数继续研究。实验中 ALL 与 AML 比较, XIAP 表达水平差异无显著性, 提示 XIAP 与 AL 的临床分型可能无关, 这也有待于进一步扩大病例数继续研究。同时我们观察到, AL 病人白血病细胞中 XIAP 表达水平高者, 接受 1 个疗程化疗后, 骨髓缓解率明显低于表达水平低者。由此, 我们初步认为 XIAP 过度表达可能是导致白血病细胞对化疗药物不敏感的原因之一, XIAP 可作为白血病基因治疗的一个新靶点。

[参考文献]

[1] 夏春波, 蒋常文. X-连锁凋亡抑制蛋白与肿瘤的关系研究进展 [J]. 中国医药导报, 2009, 4(10): 5-6.

[2] 刘建刚, 管洪在, 卢伟. 急性白血病病人白血病细胞 Survivin 基因的表达及其临床意义 [J]. 青岛大学医学院学报, 2007, 43(4): 302-304.

[3] 马锴, 沈毅. Survivin 和 c-myc 在食管鳞癌组织表达及其意义 [J]. 齐鲁医学杂志, 2006, 21(2): 106-108.

[4] DEVERAUX Q L, REED J C. IAP family proteins-suppressors of apoptosis [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(3): 239-252.

[5] 周晓彬, 纪新强, 徐莉. PPMS 1.5 统计软件的功能及其应用 [J]. 青岛大学医学院学报, 2009, 45(1): 91-93.

[6] LISON P, ROY N, TAMAI K, et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAPI and a related family of IAP genes [J]. *Nature*, 1996, 379(6563): 349-353.

[7] TAM I, RICHTER S, OLTERS DORF D, et al. High expression levels of X-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 3737-3744.

[8] TAMM I, KORNBLOU S M, SEGALL H, et al. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(5): 1796-1803.

[9] SHRIKHANDE SV, KLEEFF J, KAYED H, et al. Silencing of XIAP decreases gemlitabine resistance of pancreatic cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2006, 26: 3265-3273.

[10] CARTER B Z, MILELLA M, TSAO T, et al. Regulation and targeting of antiapoptotic XIAP in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2003, 17: 2081-2089.

(本文编辑 马伟平)