

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.12.008

文章编号: 1005-8982(2018)12-0049-04

初发急性白血病患者骨髓乳腺癌耐药蛋白基因表达及其与预后关系的研究

刘劲¹, 李薇², 段华新¹, 罗科玲², 周煦³

(湖南省人民医院 1. 肿瘤科, 2. 血液科, 3. 重症医学科, 湖南 长沙 410005)

摘要:目的 研究初发急性白血病患者骨髓乳腺癌耐药蛋白(BCRP)基因表达及其与预后关系的相关性。**方法** 选取2014年1月-2014年12月入住该院血液内科的急性白血病患者67例,同时选择50例健康志愿者作为对照组。通过实时荧光定量PCR检测骨髓BCRP基因表达,并分析比较骨髓BCRP基因表达和临床预后的关系。**结果** 急性白血病患者骨髓BCRP基因表达高于对照组($P < 0.01$),按照BCRP均值(3.0)将患者分为BCRP高表达组和BCRP低表达组。BCRP高表达组患者初始WBC计数较BCRP低表达组高($P < 0.01$),且两组生存分析比较差异有统计学意义(Log-rank=21.78, $P < 0.05$)。**结论** 急性白血病患者骨髓BCRP基因表达高于健康志愿者,且BCRP高表达患者的预后更差。

关键词: 急性白血病, 乳腺癌耐药蛋白, 基因表达, 预后

中图分类号: R733.7

文献标识码: A

Prognostic significance of breast cancer resistance protein in primary acute leukemia patients

Jin Liu¹, Wei Li², Hua-xin Duan¹, Ke-ling Luo², Xu Zhou³

(1. Department of Oncology, Hunan Province People's Hospital, Changsha, Hunan 410002, China;

2. Department of Hematology, Hunan Province People's Hospital, Changsha, Hunan 410002, China;

3. Department of Intense Care Unit, Hunan Province People's Hospital, Changsha, Hunan 410005, China)

Abstract: Objective To investigate the gene expression of breast cancer resistance protein (BCRP) in bone marrow of acute leukemia (AL) and its prognosis. **Methods** A total of 67 AL patients admitted in our hospital from January 2014 to December 2014 were enrolled in the study, and 10 healthy volunteers were involved as control group. Real-time PCR was utilized to measure the gene expression of BCRP in bone marrow. And the difference in the BCRP gene expression and its prognosis were analyzed. **Results** The gene expression of BCRP in bone marrow of AL patients was statistically higher than that in the healthy volunteer group ($P < 0.01$). Acute leukemia patients were divided into high BCRP group and low BCRP group according to the mean of BCRP (3.0). Compared with low BCRP group, the primary WBC count was higher in BCRP high group ($P < 0.01$). The survival analysis between the two groups was statistically significant (Log-rank = 21.78, $P < 0.05$). **Conclusion** The gene expression of BCRP in bone marrow of AL patients was statistically increased and associated with the prognosis. High BCRP gene expression was a risk factor for poor prognosis in patients with AL.

Keywords: acute leukemia, breast cancer resistance protein (BCRP), gene expression, prognosis

急性白血病 (acute leukemia, AL) 是血液系统造血干细胞的一种恶性克隆增殖性疾病, 其起病急,

收稿日期: 2017-03-21

[通信作者] 周煦, Tel: 13907319339; E-mail: zhouxumd@163.com

恶性程度高,严重威胁人类生命健康。异常造血细胞的增殖分化异常导致正常血细胞减少,临床主要表现为贫血、出血和感染等征象^[1]。急性白血病的发生受多基因异常调控的疾病,许多基因包括 KIT、FLT3、NPM1 和 CEBPA 均在急性白血病中表达失调,且与疾病的疗效及预后判断中具有一定的价值^[2]。急性白血病的化疗耐药是治疗过程中遇到的一大难题,乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)基因编码重要的膜转运蛋白,在白血病多药耐药方面发挥重要的作用^[3-4],影响患者的疗效和预后。目前尚无骨髓 BCRP 基因表达与急性白血病患者预后关系的研究报道。本研究拟通过实时定量 PCR 检测初发急性白血病患者骨髓 BCRP 基因表达,随访患者预后,分析骨髓 BCRP 基因表达与急性白血病预后的关联,为治疗方案的制定和优化提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2014 年 1 月-2014 年 12 月入住我院血液内科的急性白血病患者 67 例。其中,男性 36 例,女性 31 例;年龄 19 ~ 68 岁,平均 39.0 岁,中位年龄 40 岁。入选患者均符合中华医学会血液学分会制定的初发急性白血病的诊断标准^[5],并通过细胞形态学、组织化学染色及免疫学分型,其中 AML 42 例,ALL 25 例。同时还选择 50 例健康志愿者作为对照组。男性 30 例,女性 20 例;年龄 20 ~ 65 岁,平均 36.2 岁。白血病患者与健康志愿者在性别和年龄比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 标本收集及骨 BCRP 基因表达检测

取 EDTA 抗凝骨髓标本 1 ml,用生理盐水稀释 2 倍,缓慢加于 2 ml 淋巴细胞分离液上,3 000 r/min 离心 20 min,吸取单个核细胞层,并用生理盐水洗涤 3 次后通过 Trizol (Invitrogen 公司)提取总 RNA,具体按 Trizol 说明书操作。将 RNA 浓度调整至 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,逆

转录试剂盒 (TaKaRa 公司)合成 cDNA 后通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) (TaKaRa 公司)检测骨髓 BCRP 基因表达。所用引物序列如下:BCRP 正向 5'-GTTCTCAGCAGCTCTTCGGC-3',反向 5'-TCCTCCAGACACAC CACGGA-3'; β -actin 正向 5'-CCATTGGCAATGAG CGGTTTC-3',反向 5'-GTCTTTGCGGATGTCCACGT-3',引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。反应体系如下:SYBR Premix Ex Taq II (2 \times) 10 μl , PCR 正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.2 μl , PCR 反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.2 μl , ROX Reference Dye II (50 \times) 0.4 μl , cDNA 1 μl , H₂O 8.2 μl 。qRT-PCR 在 ABI 7500 仪进行,反应条件如下,95 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, (95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 35 s) \times 40 个循环,记录熔解曲线和解链温度,每个样品做 3 个复孔,并计算平均值。将健康志愿者的 BCRP 平均表达水平定义为 1,通过白血病患者患者的 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算得出患者骨髓 BCRP 基因表达^[6]。

1.3 预后随访

从初次确诊后开始随访,随访时间截止 2016 年 9 月,随访时间为 1 ~ 35 个月,中位随访时间为 27 个月。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,利用 t 检验比较组间差异;计数资料以百分比或率的形式表示,利用 χ^2 检验进行分析;骨髓 BCRP 基因表达与患者生存期分析采用 Kaplan-Meier 生存曲线和 Log-rank 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 BCRP 基因表达比较

对 67 例白血病患者和 50 例健康志愿者的骨髓单个核细胞进行 qRT-PCR 检测。白血病患者 BCRP 基因表达为 (3.0 \pm 1.2),较健康志愿者 (1.2 \pm 0.6) 升高 ($P < 0.01$),见表 1。

表 1 急性白血病患者和健康志愿者情况比较

组别	例数	年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	男 / 女 / 例	BCRP 表达 ($\bar{x} \pm s$)	WBC / ($\times 10^9/\text{L}$, $\bar{x} \pm s$)
白血病患者	67	39.0 \pm 10.2	36/31	3.0 \pm 1.2	26.4 \pm 9.1
健康志愿者	50	36.2 \pm 18.6	30/20	1.2 \pm 0.6	7.8 \pm 1.3
t/χ^2 值		1.041	0.458	9.730	14.329
P 值		0.300	0.500	0.001	0.001

2.2 不同 *BCRP* 基因表达的 AL 患者情况比较

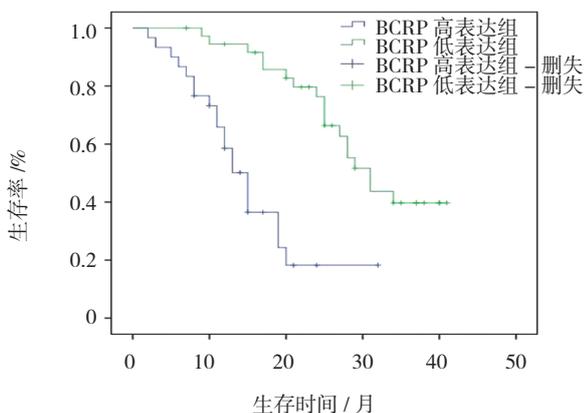
依照白血病患者 *BCRP* 基因表达均值 (3.0), 将其分为 *BCRP* 高表达组 (4.1 ± 0.7) 和 *BCRP* 低表达组 (2.1 ± 0.5), 两组间白血病患者年龄、性别和分型差异无统计学意义 ($P > 0.05$); *BCRP* 高表达组白血病患者初始 WBC 计数较 *BCRP* 低表达组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 见表 2。

2.3 不同 *BCRP* 基因表达的 AL 患者生存分析

AL 患者的生存时间为 25 个月, 其中 *BCRP* 高表达组急性白血病患者中位生存时间为 15 个月, *BCRP* 低表达组急性白血病患者中位生存时间为 31 个月, 两组生存分析比较差异有统计学意义 ($\text{Log-rank}=21.78, P < 0.05$), 见附图。

表 2 不同 *BCRP* 基因表达 AL 患者情况比较

组别	例数	<i>BCRP</i> 表达 / ($\bar{x} \pm s$)	年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	男 / 女 / 例	分型 / 例	WBC ($\times 10^9/L, \bar{x} \pm s$)
<i>BCRP</i> 高表达组	30	4.1 ± 0.7	37.3 ± 8.6	15/15	18/12	33.8 ± 6.6
<i>BCRP</i> 低表达组	37	2.1 ± 0.5	40.5 ± 11.3	21/16	24/13	20.5 ± 6.1
t / χ^2 值		13.623	1.279	0.304	0.168	8.555
P 值		0.000	0.205	0.581	0.682	0.000



附图 AL 患者 *BCRP* 基因高低表达组间的生存曲线

3 讨论

随着社会生活方式的改变及环境污染问题的日渐严重, AL 的发生率呈现出上升的趋势。而患者的疗效和预后各异, 这与疾病的年龄、分型或基因异常等因素相关, 目前对于临床 AL 预后判断尚缺乏特异性的指标^[7]。而对于化疗的耐药是影响白血病疗效和预后的一个重要因素^[8], 化疗耐药主要是受到 ABC 转运蛋白超家族的调控^[9], *BCRP* 作为其中的一种日益受到研究者的关注。

本研究中, 笔者首先检测 AL 组和健康志愿者骨髓 *BCRP* 基因表达情况, 发现 AL 患者骨髓 *BCRP* 基因表达高于健康人 ($P < 0.01$)。按照 *BCRP* 基因表达的均值将白血病患者分为 *BCRP* 高表达组和 *BCRP* 低表达组, 发现 *BCRP* 高表达组患者初始白细胞计数更高 ($P < 0.001$), 同时中位生存时间更短, 生存分析比

较有差异, 提示骨髓 *BCRP* 基因表达水平可能作为一个 AL 患者预后判断的生物学标志物。

BCRP 基因定位于染色体 4q22.1, 其编码蛋白定位于细胞膜及细胞核, 膜表面的 *BCRP* 能将化疗药物转运出细胞外, 从而细胞内药物浓度, 影响化疗疗效^[10]。能够影响氨甲喋呤和阿霉素等常用化疗药物, 引起多药耐药的发生^[11]。以往的研究也证实, 急性白血病时 *BCRP* 基因表达升高^[12], 与本研究中的结论一致, 且不同的骨髓 *BCRP* 基因表达组之间患者初始白细胞计数以及生存率也有差异, 表明骨髓 *BCRP* 基因表达对于 AL 预后预测有一定的价值。同时, qRT-PCR 技术检测基因表达水平, 结果快速且准确, 且易于临床检验的开展^[13]。

综上所述, AL 患者骨髓 *BCRP* 基因表达高于健康志愿者, 且 *BCRP* 高表达患者的预后更差。骨髓 *BCRP* 基因表达对于 AL 的预后有着重要的意义, 能为 AL 患者治疗方案的制定和优化提供依据, 并辅助判断其预后, 同时尚需更大样本量的研究以明确骨髓 *BCRP* 基因表达与 AL 预后的相关性, 进一步提高其临床指导应用价值。

参考文献:

- [1] GREENBLATT S M, NIMER S D. Chromatin modifiers and the promise of epigenetic therapy in acute leukemia[J]. *Leukemia*, 2014, 28(7): 1396-1406.
- [2] FORAN J M. New prognostic markers in acute myeloid leukemia: perspective from the clinic[J]. *Hematology*, 2010, 2010(1): 47-55.
- [3] NOGUCHI K, KATAYAMA K, MITSUHASHI J, et al. Functions

- of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in chemotherapy[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(1): 26-33.
- [4] BRACKMAN DEANNA J, GIACOMINI KATHLEEN M. Reverse translational research of ABCG2 (BCRP) in human disease and drug response[J]. *Clin. Pharmacol. Ther*, 2018, 103(2): 233-242.
- [5] 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.
- [6] ADNAN M, MORTON G, HADI S. Analysis of rpoS and bolA gene expression under various stress-induced environments in planktonic and biofilm phase using 2(- $\Delta\Delta$ CT) method[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 357(1): 275-282.
- [7] LIN T L, SMITH B D. Prognostically important molecular markers in cytogenetically normal acute myeloid leukemia[J]. *Am J Med Sci*, 2011, 341(5): 404-408.
- [8] de MORAES A C, MARANHO C K, RAUBER G S, et al. Importance of detecting multidrug resistance proteins in acute leukemia prognosis and therapy[J]. *J Clin Lab Anal*, 2013, 27(1): 62-71.
- [9] 顾卓伟, 狄文. 应用 ABC 转运蛋白抑制剂治疗肿瘤化疗耐药的现状与对策[J]. *现代妇产科进展*, 2015(4): 299-302.
- [10] NATARAJAN K, XIE Y, BAER M R, et al. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(8): 1084-1103.
- [11] 吴祥猛, 盛莉, 贾雨霏, 等. 乳腺癌耐药蛋白在药物代谢动力学中的作用[J]. *药学学报*, 2016, 51(9): 1368-1377.
- [12] 李薇, 周明, 罗科玲, 等. 急性髓系白血病中乳腺癌耐药蛋白基因表达与临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(2): 29-32.
- [13] VY G, FILION M. New developments in quantitative real-time polymerase chain reaction technology[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2014, 16(1): 1-5.

(王荣兵 编辑)