

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.21.009

文章编号: 1005-8982(2017)21-0049-05

HIF-1 α 在成人急性淋巴细胞白血病患者骨髓单个核细胞中的表达及意义*

云清英¹, 徐刚²

(1. 山东中医药大学第二附属医院 检验科, 山东 济南 250001;

2. 中国医科大学第四医院, 辽宁 沈阳 110000)

摘要:目的 探讨低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 在成人急性淋巴细胞白血病(ALL)患者骨髓单个核细胞中的表达及意义。**方法** 选取 73 例成人初诊 ALL 患者, 同期留取非白血骨髓 30 份作为对照组, 采集并分离骨髓单个核细胞, 利用实时荧光定量聚合酶链反应技术检测骨髓单个核细胞中 HIF-1 α 基因表达, 利用 Kaplan-Meier 生存分析分析 HIF-1 α 基因表达对患者无复发生存时间的影响。**结果** 成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中 HIF-1 α mRNA 相对表达量(1.86 \pm 0.18), 高于对照组(1.17 \pm 0.09), 差异有统计学意义($t=25.020$, $P=0.000$); B 系-ALL(B-ALL)和 T 系-ALL(T-ALL)患者骨髓单个核细胞中 HIF-1 α mRNA 相对表达量均高于对照组($P<0.05$), 而 B-ALL 和 T-ALL 患者之间差异无统计学意义($t=0.807$, $P=0.211$); 费城染色体(Ph)阳性和 Ph 阴性患者 HIF-1 α mRNA 相对表达量均高于对照组($P<0.05$), 而 Ph 阳性和 Ph 阴性患者之间差异无统计学意义($t=1.314$, $P=0.096$); B-ALL 和 T-ALL 成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中 HIF-1 α 信使核糖核酸(mRNA)相对表达量均与性别、年龄、白细胞水平和危险度分级无关($P>0.05$); 以 HIF-1 α mRNA 相对表达量的 P25 为截点, 将患者分为低表达组($n=18$)和高表达组($n=55$), 低表达组随访中复发 4 例, 复发率 22.2%, 高表达组随访中复发 20 例, 复发率 36.4%, Kaplan-Meier 生存分析显示, 低表达组无复发生存时间 11.2 个月, 长于高表达组的 8.6 个月, 但差异无统计学意义($\chi^2=1.771$, $P=0.183$)。**结论** HIF-1 α 在成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中呈高表达, 可能与 ALL 患者化疗耐药及复发相关。

关键词: 急性淋巴细胞白血病; 成人; 低氧诱导因子-1 α ; 骨髓单个核细胞

中图分类号: R733.71

文献标识码: A

Expression and significance of HIF-1 α in bone marrow mononuclear cells of adult patients with ALL*

Qing-ying Yun¹, Gang Xu²

(1. Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital, Shandong University of Traditional

Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250001, China; 2. The Fourth Hospital of

China Medical University, Shenyang, Liaoning 110000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in bone marrow mononuclear cells of adult patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Methods** Seventy-three adult patients with newly-diagnosed ALL were selected. In the same period, 30 samples of bone marrow from non-leukemic patients were selected as the control group. Bone marrow mononuclear cells were harvested and isolated. The expression of HIF-1 α gene in bone marrow mononuclear cell was detected by qRT-PCR. The effect of the expression of HIF-1 α gene on the relapse-free survival time was analyzed by Kaplan-Meier. **Results** The relative expression level of HIF-1 α mRNA in bone marrow mononuclear cells of the adult patients with newly diagnosed ALL was (1.86 \pm 0.18), which was significantly higher than that of

收稿日期: 2017-01-17

* 基金项目: 辽宁省自然科学基金(No: 2013021039)

the control group (1.17 ± 0.09), and the difference was statistically significant ($t = 25.020$, $P = 0.000$). The relative expression levels of HIF-1 α mRNA in bone marrow mononuclear cells of the patients with B-ALL and T-ALL were higher than those of the control group ($P < 0.05$), while there was no significant difference between those with B-ALL and T-ALL ($t = 0.807$, $P = 0.211$). The relative expression levels of HIF-1 α mRNA in bone marrow mononuclear cells of Philadelphia chromosome (Ph)-positive and Ph-negative patients were higher than those of the control group ($P < 0.05$), while there was no significant difference between Ph-positive group and Ph-negative group ($t = 1.314$, $P = 0.096$). The relative expression levels of HIF-1 α mRNA in bone marrow mononuclear cells of the B-ALL and T-ALL patients were unrelated with sex, age, leukocyte level or risk grade ($P > 0.05$). According to the cutoff value of P25 of the relative expression level of HIF-1 α mRNA, the patients were divided into the low expression group ($n = 18$) and the high expression group ($n = 55$). During the follow-up period, 4 cases in the low expression group had recurrence, the recurrence rate was 22.2%; 20 cases in the high expression group had recrudescence, the recurrence rate was 36.4%. Kaplan-Meier survival analysis showed that the relapse-free survival time in the low expression group was 11.2 months, which was longer than that of the high expression group (8.6 months), but the difference was not statistically significant ($\chi^2 = 1.771$, $P = 0.183$). **Conclusions** HIF-1 α is highly expressed in bone marrow mononuclear cells of adult patients with newly diagnosed ALL. It may be associated with chemotherapy resistance and recurrence.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia; adult; HIF-1 α ; bone marrow mononuclear cells

急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 约占成人急性白血病的 21% ~ 30%, 是成人最为常见的急性白血病类型^[1], 虽然已有的治疗手段可使多数患者缓解, 但成人 ALL 患者复发率较高, 且易发生化疗耐药, 严重影响患者预后^[2]。目前, ALL 发病机制尚未完全清楚, 有研究指出^[3], 缺氧微环境与肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭及化疗耐药密切相关。亦有研究指出^[4], 缺氧是急性白血病患者骨髓微环境的重要组成部分, 与细胞增殖及化疗敏感性有关。低氧诱导因子 -1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 作为缺氧条件下机体重要的调控因子, 与多种恶性肿瘤发生及进展有关, 在调控肿瘤细胞增殖、分化、生长、侵袭及血管新生等生物学功能中发挥重要作用^[5]。有研究指出^[6], 在原代急性髓系白血病细胞中 HIF-1 α 呈高表达。本研究拟对成人 ALL 患者外周血单个核细胞中 HIF-1 α 表达进行分析, 旨在探讨 HIF-1 α 在成人 ALL 发病及进展中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 临床资料 选取 2012 年 2 月 -2015 年 12 月在本院住院治疗的成人初诊 ALL 患者 73 例。其中, 男性 33 例, 女性 40 例; 年龄 20 ~ 57 岁, 中位年龄 36.4 岁; 所有患者均经骨髓细胞学、分子生物学、遗传学及免疫分型检查确诊; B 系 ALL (B-ALL) 46 例, T 系 ALL (T-ALL) 27 例; Ph 阳性 13 例, Ph 阴性 60 例。同期, 留取非白血病骨髓 30 份作为对照组,

均排除血液系统疾病、恶性肿瘤、急慢性感染及其他疾病者。其中, 男性 18 例, 女性 12 例; 年龄 19 ~ 59 岁, 中位年龄 37.1 岁。本研究通过医院伦理委员会批准, 所有研究对象均行知情同意。

1.1.2 主要试剂和设备 总核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 提取试剂盒 (Trizol 法) (购自美国 Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒和聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增试剂盒 (均购自大连宝生物公司), HIF-1 α 及内参引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计合成, Fic011 分离液购自中科院血液病研究所, 实时荧光定量 PCR 仪 (购自美国 Bio-rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 治疗方案及效果评估 所有患者均按照《中国成人急性淋巴细胞白血病诊断与治疗专家共识》^[7] 方案进行治疗, 并进行效果评估。初诊之前均未进行过 ALL 相关治疗, 复发前均按照正规的化疗方案进行治疗, 经过第 1 个疗程治疗后, 完全缓解 49 例, 未缓解 24 例。

1.2.2 标本采集及骨髓单个核细胞分离 所有研究对象于无菌操作下抽取骨髓约 5 ml, 抗凝, 4 h 内按等体积比缓慢加入到 Fic011 分离液上层, 于 1500 转 /min, 离心 15 min, 细胞分为 3 层, 将位于中间层的单个核细胞小心吸出, 置入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存待备检。

1.2.3 利用实时荧光定量 PCR 技术检测骨髓单个核细胞中 HIF-1 α 基因表达 取骨髓单个核细胞, 加入细胞裂解液进行裂解后, 用总 RNA 提取试剂盒

对单个核细胞中总 RNA 进行提取,利用紫外分光光度计对总 RNA 纯度进行检测,取 A260/A280 \geq 1.80 作为合格样品。用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录为模板单链 cDNA,用互补脱氧核糖核酸(complementary deoxyribonucleic acid,cDNA)为模板,用 PCR 试剂盒进行 PCR。引物序列:HIF-1 α 引物,正向 5'-GGGGAGGACGATGAACATCAA-3';反向 5'-GGGTG GTTCTTGTACCCACA-3'。 β -actin,正向 5'-GGCT GTATCCCCTCCATCG-3';反向 5'-CCAGTTGGTAA CAATGCCATGT-3'。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,76 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,连续进行 38 次循环。每个样品均设置 3 个平行反应复孔。用 2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对骨髓单个核细胞中 HIF-1 α 基因相对表达量。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组比较用独立样本 t 检验,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD- t 检验,利用 Kaplan-Meier 生存分析 HIF-1 α 基因表达对患者无复发生存时间的影响, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中 HIF-1 α 基因表达情况

成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中 HIF-1 α mRNA 相对表达量(1.86 \pm 0.18),高于对照组的(1.17 \pm 0.09),差异有统计学意义($t=25.020$, $P=0.000$)。

2.2 不同亚型成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中 HIF-1 α 基因表达比较

B-ALL 和 T-ALL 成人初诊 ALL 患者骨髓单个

核细胞中 HIF-1 α mRNA 相对表达量分别为(1.83 \pm 0.11)和(1.92 \pm 0.25),均高于对照组,差异有统计学意义($t=31.199$ 和 13.188, $P<0.05$),而 B-ALL 和 T-ALL 患者比较差异无统计学意义($t=0.807$, $P=0.211$);Ph 阳性和 Ph 阴性患者 HIF-1 α mRNA 相对表达量分别为(1.81 \pm 0.09)和(1.87 \pm 0.16),均高于对照组,差异有统计学意义($t=25.467$ 和 20.718, $P<0.05$),而 Ph 阳性和 Ph 阴性患者比较差异无统计学意义($t=1.314$, $P=0.096$)。

2.3 成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中 HIF-1 α 基因表达与临床指标的关系

B-ALL 和 T-ALL 成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中 HIF-1 α mRNA 相对表达量均与性别、年龄、白细胞水平和危险度分级比较差异无统计学意义($P>0.05$)(见附表)。

2.4 不同治疗效果成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中 HIF-1 α 基因表达比较

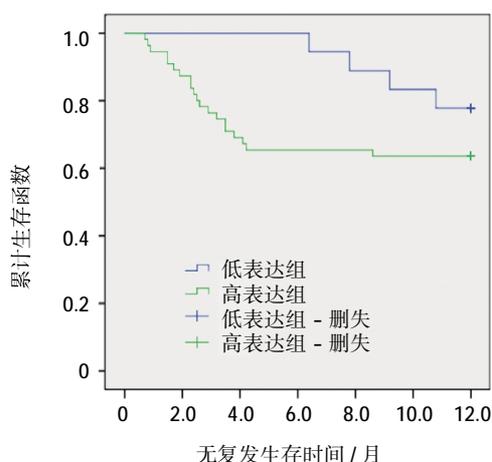
完全缓解组成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中 HIF-1 α mRNA 相对表达量为(1.73 \pm 0.10),低于未缓解组的(1.82 \pm 0.12),差异有统计学意义($t=2.874$, $P=0.003$)。

2.5 成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中 HIF-1 α 基因表达与复发的相关性

所有患者均随访 1 年,未出现失访病例,随访过程中复发 24 例。以 HIF-1 α mRNA 相对表达量的 P25 为截点,患者分为低表达组($n=18$)和高表达组($n=55$),低表达组随访中复发 4 例,复发率 22.2%,高表达组随访中复发 20 例,复发率 36.4%,Kaplan-Meier 生存分析显示,低表达组无复发生存时间 11.2 个月,长于高表达组的 8.6 个月,但差异无统计学意义($\chi^2=1.771$, $P=0.183$)(见附图)。

附表 成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中 HIF-1 α 基因表达与临床指标的关系 ($\bar{x}\pm s$)

临床指标	性别/例		年龄/岁			白细胞水平(个/L)		危险度分级	
	男	女	≤ 35	35~50	50~69	B系 $<30\times 10^9$ 或 T系 $<100\times 10^9$	B系 $\geq 30\times 10^9$ 或 T系 $\geq 100\times 10^9$	标危	高危
B-ALL	20	26	15	18	13	22	24	18	28
HIF-1 α mRNA	1.80 \pm 0.09	1.85 \pm 0.16	1.81 \pm 0.10	1.84 \pm 0.13	1.87 \pm 0.17	1.82 \pm 0.12	1.88 \pm 0.18	1.79 \pm 0.08	1.85 \pm 0.19
t/F 值	1.479		2.018			0.629		0.954	
P 值	0.073		0.145			0.266		0.173	
T-ALL	13	14	7	12	8	12	15	13	16
HIF-1 α mRNA	1.88 \pm 0.17	1.94 \pm 0.24	1.90 \pm 0.19	1.93 \pm 0.22	1.96 \pm 0.27	1.87 \pm 0.21	1.97 \pm 0.26	1.91 \pm 0.20	1.95 \pm 0.28
t/F 值	1.207		0.469			0.477		0.634	
P 值	0.119		0.631			0.319		0.266	



附图 成人初诊 ALL 患者 HIF-1 α mRNA 相对表达量对无复发生存时间的影响

3 讨论

ALL 作为成人常见的急性白血病类型,化疗耐药及复发是影响患者预后的主要因素,即使是复发后采取更强的化疗药物治疗,治愈率仅有 30%~40%^[7],而且这些患者再次化疗失败风险较高、生存率则更低^[8]。因此,积极探讨影响成人 ALL 化疗耐药及复发的相关因素,对改善患者预后具有重要意义。有研究指出^[9],白血病患者骨髓微环境缺氧在化疗耐药及白血病细胞增殖中发挥重要作用。HIF-1 作为重要的缺氧诱导因子,在常氧环境中性质不稳定,而在缺氧环境下可稳定存在,且与细胞增殖、分化、生长及侵袭能力有关,HIF-1 α 是 HIF-1 重要的亚基类型,在 HIF-1 发挥作用中起关键性作用^[10]。恶性肿瘤细胞由于过度增殖,远超肿瘤血管供氧能力而使组织局部缺氧,成为恶性肿瘤重要特征^[11],现有研究已证实^[12],HIF-1 α 在多数实体瘤组织中存在不同程度高表达。本研究显示,成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中 HIF-1 α mRNA 相对表达量高于对照组,说明 HIF-1 α 在成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中呈高表达,可能参与了 ALL 的发生。

在对不同亚型成人初诊 ALL 患者分析发现,成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中 HIF-1 α mRNA 相对表达量在 B-ALL 和 T-ALL、Ph 阳性和 Ph 阴性比较无差异,说明 HIF-1 α 基因在成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中高表达与 ALL 的亚型无关,提示成人 ALL 患者骨髓造血微环境可能普遍存在缺氧改变,与 ALVAREZ-MARTINS 等^[13]研究结论相同。本研究在分析骨髓单个核细胞中 HIF-1 α 基因

表达与临床指标相关性时发现,ALL 患者骨髓单个核细胞中 HIF-1 α 基因表达与性别、年龄、白细胞水平和危险度分级无关,但可以看出,女性、年龄 50~69 岁、白细胞水平升高、高危患者 HIF-1 α 基因表达水平呈升高趋势,分析原因可能与本研究样本量较少有关。本研究显示,完全缓解组成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中 HIF-1 α mRNA 相对表达量低于未缓解组,说明 HIF-1 α 可能与成人初诊 ALL 患者化疗效果有关,可能参与化疗耐药的发生,进一步随访 1 年发现,HIF-1 α 基因低表达组,复发率 22.2%,低于高表达组的 36.4%,Kaplan-Meier 生存分析显示,低表达组无复发生存时间 11.2 个月,长于高表达组的 8.6 个月,但差异无统计学意义,提示成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中 HIF-1 α 基因高表达可能参与了患者复发,是导致 ALL 患者对化疗药物不敏感及复发的因素。

综上所述,HIF-1 α 在成人初诊 ALL 患者骨髓单个核细胞中呈高表达,可能与 ALL 患者化疗耐药及复发相关,有望成为成人 ALL 治疗靶点,尤其为难治复发性患者治疗提供靶点。

参 考 文 献:

- [1] 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会、中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 中国成人急性淋巴细胞白血病诊断与治疗指南(2016 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(10): 837-845.
- [2] DOAN T N, KIRKPATRICK C M, WALKER P, et al. Primary antifungal prophylaxis in adult patients with acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre audit [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016, 71(2): 497-505.
- [3] MUZ B, DE LA PUENTE P, AZAB F, et al. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy[J]. Hypoxia (Auckl), 2015, 3(11): 83-92.
- [4] DROLLE H, WAGNER M, VASOLD J, et al. Hypoxia regulates proliferation of acute myeloid leukemia and sensitivity against chemotherapy[J]. Leuk Res, 2015, 39(7): 779-785.
- [5] BAN H S, UTO Y, WON M, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF) inhibitors: a patent survey (2011-2015)[J]. Expert Opin Ther Pat, 2016, 26(3): 309-322.
- [6] 陈萍, 姜熙, 黄慧芳, 等. HIF-1 α 在原代急性髓系白血病细胞中的表达及其与预后的关系[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(1): 19-23.
- [7] 中华医学会血液学分会, 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会. 中国成人急性淋巴细胞白血病诊断与治疗专家共识[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(9): 789-792.
- [8] THOMAS X, LE JEUNE C. Treating adults with acute lymphocytic leukemia: new pharmacotherapy options [J]. Expert Opin

- Pharmacother, 2016, 17(17): 2319-2330.
- [9] BENITO J, ZENG Z, KONOPLEVA M, et al. Targeting hypoxia in the leukemia microenvironment[J]. *Int J Hematol Oncol*, 2013, 2(4): 279-288.
- [10] IOANNOU M, PARASKEVA E, BAXEVANIDOU K, et al. HIF-1 α in colorectal carcinoma: review of the literature[J]. *J BUON*, 2015, 20(3): 680-689.
- [11] HILL R P, BRISTOW R G, FYLES A, et al. Hypoxia and predicting radiation response[J]. *Semin Radiat Oncol*, 2015, 25(4): 260-272.
- [12] HU X, FANG Y, ZHENG J, et al. The association between HIF-1 α polymorphism and cancer risk: a systematic review and meta-analysis[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(2): 903-916.
- [13] ALVAREZ-MARTINS I, REMEDIO L, MATIAS I, et al. The impact of chronic intermittent hypoxia on hematopoiesis and the bone marrow microenvironment [J]. *Pflugers Arch*, 2016, 468(5): 919-932.