

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.02.006
文章编号: 1005-8982(2016)02-0029-04

论著

急性髓系白血病中乳腺癌耐药蛋白基因表达 与临床意义*

李薇,周明,罗科玲,谭熹,雷平,邹彬宾
(湖南省人民医院 血液科,湖南 长沙 410005)

摘要:目的 研究急性髓系白血病(AML)患者乳腺癌耐药蛋白(*BCRP*)基因的表达以及在预后判断中的意义。**方法** 构建实时定量 PCR 检测 *BCRP* 基因表达的技术,定量检测 20 例初治组 AML 患者、20 例完全缓解组 AML 患者及 20 例难治复发组 AML 患者 *BCRP* 基因的表达水平,分析其在 AML 患者和非血液系统恶性肿瘤患者中的差异及与临床疗效的关系。**结果** 急性髓系白血病患者中 *BCRP* 的表达高于对照组($P < 0.01$),初治组、完全缓解组、难治复发组的 *BCRP* 表达均存在差异($P < 0.01$),其中难治复发组表达最高,初治组次之,完全缓解组最低。**结论** *BCRP* 基因在急性髓系白血病患者中表达增高,*BCRP* 的表达水平可能是疾病进展的重要标志,可能是 AML 的独立危险因素。

关键词: 急性髓系白血病;*BCRP* 基因;危险因素

中图分类号: R733.7

文献标识码: A

Expression of *BCRP* gene and its clinical significance in patients with acute myeloid leukemia*

Wei Li, Ming Zhou, Ke-ling Luo, Xi Tan, Ping Lei, Bin-bin Zou
(Department of Hematology, Hunan Provincial People's Hospital,
Changsha, Hunan 410005, China)

Abstract: Objective To explore the expression and prognostic value of breast cancer resistance protein (*BCRP*) gene in acute myeloid leukemia (AML). **Methods** Real time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) method was performed to detect the mRNA of *BCRP* in AML group ($n = 60$) and non-hematologic malignancy group ($n = 20$). The difference in the *BCRP* expression of both groups was studied and its correlation with clinical effect was analyzed. **Results** The *BCRP* gene expression level in the AML patients was statistically higher than that in the control group ($P < 0.01$). Significant difference was found among the newly-diagnosed AML group, the relapsed AML group and the complete remission (CR) AML group and the control group ($P < 0.01$). The *BCRP* gene expression level was different in different disease stages with the highest level in the relapsed group and the lowest in the complete-remission group. **Conclusions** *BCRP* gene expression increases in AML patients. The expression level of *BCRP* gene can be a useful biomarker for evaluation of AML progression, and may be an independent risk factor of AML.

Keywords: AML; breast cancer resistance protein gene; risk factor

急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是一组临床和生物学行为存在高度异质性的

疾病,AML 的发生是由于髓系白血病细胞增殖失控、分化障碍、凋亡受阻,但其具体病因和发病机制

收稿日期:2015-07-09

* 基金项目:湖南省科技厅科技项目(No:2011SK3156)

尚未完全清楚。化学治疗是其主要的治疗方式,多重耐药(multidrug resistance,MDR)是导致化疗耐药一个重要途径,进而导致其治疗失败。国内外研究发现,与MDR相关的基因包括MDR1/ABCB1、MRP1/ABCC1、LRP1/MVP和BCRP1/ABCG2基因等^[1-2]。乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein,BCRP)基因位于染色体4q22,全长66 kb。BCRP属于ABC转运蛋白超家族(ATP binding cassette transporters)G亚族的第2位成员,在肿瘤细胞的侧群细胞中高表达,是一种与肿瘤耐药相关的半转运蛋白^[3]。多项研究表明,BCRP基因的高表达可以导致化疗耐药,包括米托蒽醌、柔毛霉素、阿霉素、托泊替康等^[4],从而影响AML患者的完全缓解期以及生存期,导致不良预后^[5-6]。Damiani等^[7]的研究表明,在成人AML患者中氟达拉滨化疗治疗不能抑制BCRP基因高表达的负效应。Damiani等^[8]的最新研究表明,高表达BCRP基因可影响异体骨髓干细胞移植的效果,会导致更短的白血病无病生存期以及更高的累积复发率^[9]。Tiribelli等的研究表明,同时出现BCRP基因过表达和FLT3-ITD突变可以导致AML患者出现高复发风险。有研究^[10]认为,BCRP导致AML患者化疗耐药的作用是有限的。为进一步探讨BCRP基因在AML中的表达及其预后意义,本研究检测60例AML患者和20例非恶性血液病患者BCRP基因的表达量并探讨其临床预后意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料

AML标本:病例为2011年9月-2014年9月期间湖南省人民医院血液科经细胞形态学、组织化学染色及流式细胞术免疫学分型确诊的AML患者。具体如下:AML患者60例,男33例,女27例。 M_1 (急性粒细胞白血病未分化型):3例, M_2 (急性粒细胞白血病部分分化型):19例, M_3 (急性早幼粒细胞白血病):15例, M_4 (急性粒单细胞白血病):11例, M_5 (急性单核细胞白血病):11例, M_6 (红白血病):1例。其中初治病例20例,男9例,女11例,年龄19~81岁,中位年龄44.5岁;完全缓解病例20例,男13例,女7例,年龄11~66岁,中位年龄43岁;难治复发病例20例,男11例,女9例,年龄16~75岁,中位年龄42.5岁。对照组:20例非血液系统恶性肿瘤及非恶性实体瘤患者(包括ITP或缺铁贫、白细胞减少等),男9例,女11例,年龄15~82岁,中

位年龄44岁。

1.2 主要仪器与试剂

Realtime-PCR仪(ABI)7900型,水平电泳槽(北京君意东方仪器公司),JY-SPC,电泳仪(北京鼎国生物技术发展中心),DG-III双稳数显电泳仪,高速离心机(SIGMA)1-13。Trizol RNA抽提试剂盒(In-vitrogen,15596-026),Revert Aid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒(Fermentas K1631),Deoxyribonuclease I 脱氧核糖核酸酶 I (Fermentas EN0521),Ribo Lock™ Ribonuclease Inhibitor 核糖核酸酶抑制剂 (Fermentas EO0381),SYBR Green PCR Master Mix(ABI 4309155)。

1.3 引物的合成

BCRP正向引物序列为:5'-ACCTGAAGGCATTTACTGAA-3',反向引物序列为:5'-TCTTTCCTTGACCTAAGAC-3',产物长度214 bp,TM值59℃。采用 β -actin为内参基因,正向序列为:5'-CATTAAAGGA GAAGCTGTGCT-3',反向序列为:5'-GTTGAAGGTA GTTTCGTGGA-3',片段长度为208 bp。

1.4 RT-PCR 检测 mRNA 表达

收集AML实验组和对照组骨髓单个核细胞,用Trizol RNA抽提试剂盒提取实验组与对照组的总RNA,紫外分光光度仪检测RNA的浓度和纯度。取2 μ g RNA样品,按照试剂盒说明书逆转录成cDNA。25 μ l RT-PCR反应体系:1 μ l cDNA模板,100 nmol引物A和引物B,12.5 μ l 2 \times SYBR Green PCR Master mix,灭菌双蒸水加至25 μ l。反应条件为反转录后95℃、5 min,94℃变性20 s,61℃退火20 s,72℃延伸20 s,40个循环后72℃、5 min,55℃退火10 s,往后每个循环加0.5℃,80个循环。循环结束后进行融点曲线分析,于60℃~95℃之间进行测定,条件设置为升温幅度0.5℃/次,5 s/次。反应结束后软件自动算出mRNA拷贝数。考虑到各个样本总RNA浓度可能存在差异,最终计算结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (RQ)值(Ct 基本循环数、 ΔCt =基本循环与内参循环数差值、 $\Delta\Delta Ct^*$ =最低样本 ΔCt 值-其他各样本 ΔCt 值)来表达基因的表达水平。反应结束后取PCR产物在琼脂糖凝胶电泳中分离,紫外灯下观察并拍照。

1.5 统计学方法

采用SPSS 13.0统计学软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数比较用 t 检验和Mann-Whitney U 检验, $P < 0.05$ 为差

异有统计学意义。

2 结果

2.1 BCRP 基因的表达水平在 AML 患者与对照组的比较

RT-PCR 显示 60 例 AML 患者及 20 例对照组患者均可检测到 BCRP 基因的 mRNA 表达,使用 β -actin 内参基因校正。使用 SPSS 13.0 软件获得 BCRP 的 mRNA 半定量均值。统计分析显示,AML 患者中初治组、缓解组、复发组的 BCRP mRNA 相对表达量均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$) (见附表)。

附表 BCRP mRNA 相对表达量

组别	例数	mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$)
初治组	20	3.632 \pm 0.356 [†]
缓解组	20	2.326 \pm 0.224 [†]
复发组	20	5.953 \pm 0.673 [†]
对照组	20	1.096 \pm 0.078

注:† 与对照组比较, $P < 0.01$

2.2 AML 患者不同病程阶段 BCRP 基因表达水平的变化

根据初治组 20 例、缓解组 20 例和复发组 20 例患者的 BCRP 基因的 mRNA 相对表达水平, Mann-Whitney U 检验显示,初治组与完全缓解组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),初治组与复发组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),缓解组与复发组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。即 3 个病程下 BCRP 基因的表达水平在复发组中表达最高,初治组次之,缓解组表达最低。

3 讨论

目前,治疗 AML 的方法主要有化学治疗、造血干细胞移植及生物靶向治疗等。在治疗过程中,化疗耐药是导致治疗失败的一个重要原因。多重耐药通过上调膜转运蛋白将肿瘤细胞中的化疗药物泵到体外,从而导致化疗耐药^[9]。ABC 转运蛋白超家族是导致 MDR 的一类重要物质,BCRP 是 ABC 转运蛋白超家族 G 亚族的第 2 位成员,近年来受到越来越多的研究者的关注。

本研究中,BCRP 基因在不同病程的 AML 患者中的表达显著高于对照组,同时,在 AML 的不同病

程中,复发组的 BCRP 基因表达最高,初治组次之,缓解组最低,提示 BCRP 基因高表达与 AML 疾病的发生有关,同时,BCRP 基因高表达可导致疾病更易复发,可能与其导致的化疗耐药有关。BCRP 基因可能成为改善 AML 预后,延长患者完全缓解期、降低复发率的重要生物学靶点。

BCRP 基因的表达对 AML 的治疗有重要意义,目前更多的研究已经深入到 BCRP 化疗耐药机制的研究,Huang 等人^[10]的研究表明,在成人急性白血病中,通过 PI3K/Akt 途径使 PTEN 蛋白失活可上调 BCRP 表达和侧群细胞。Campbell 等人^[12]的研究则在儿童 M7 AML 中发现一个新的、BCRP 组织特异性启动子。因此,研究 BCRP 基因高表达导致 AML 化疗耐药的信号通路机制将是一个值得深入研究的方向。

参 考 文 献:

- [1] Van Den Heuvel-Eibrink MM, Van Der Holt B, Burnett AK, et al. CD34-related coexpression of MDR1 and BCRP indicates a clinically resistant phenotype in patients with acute myeloid leukemia (AML) of older age [J]. Ann Hematol, 2007, 86 (5): 329-337.
- [2] Nasilowska-Adamska B, Solarska I, Paluszewska M, et al. FLT3-ITD and MLL-PTD influence the expression of MDR-1, MRP-1, and BCRP mRNA but not LRP mRNA assessed with RQ-PCR method in adult acute myeloid leukemia [J]. Ann Hematol, 2014, 93(4): 577-593.
- [3] 应帅, 郑婷婷, 陈培远. BCRP/ABCG2 的结构功能及相关抑制剂研究 [J]. 中国医药生物技术, 2013, 3(8): 201-205.
- [4] Litman T, Brangi M, Hudson E, et al. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2) [J]. J Cell Sci, 2000, 113(Pt11): 2011-2021.
- [5] Benderra Z, Faussat AM, Sayada L, et al. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(23): 7896-7902.
- [6] Damiani D, Tiribelli M, Calistri E, et al. The prognostic value of P-glycoprotein (ABCB) and breast cancer resistance protein (ABCG2) in adults with de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype [J]. Haematologica, 2006, 91(6): 825-828.
- [7] Damiani D, Tiribelli M, Michelutti A, et al. Fludarabine-based induction therapy does not overcome the negative effect of ABCG2 (BCRP) over-expression in adult acute myeloid leukemia patients [J]. Leuk Res, 2010, 34(7): 942-945.
- [8] Damiani D, Tiribelli M, Geromin A, et al. ABCG2 overexpression in patients with acute myeloid leukemia: Impact on stem cell transplantation outcome [J]. Am J Hematol, 2015, 90(9): 784-789.

- [9] Tiribelli M, Geromin A, Michelutti A, et al. Concomitant ABCG2 overexpression and FLT3ITD mutation identify a subset of acute myeloid leukemia patients at high risk of relapse[J]. *Cancer*, 2011, 117(10): 2156-2162.
- [10] Svirnovski AI, Shman TV, Serhiyenka TF, et al. ABCB1 and ABCG2 proteins, their functional activity and gene expression in concert with drug sensitivity of leukemia cells[J]. *Hematology*, 2009, 14(4): 204-212.
- [11] Huang FF, Wu DS, Zhang L, et al. Inactivation of PTEN increases ABCG2 expression and the side population through the PI3K/Akt pathway in adult acute leukemia[J]. *Cancer Lett*, 2013, 336(1): 96-105.
- [12] Campbell PK, Zong Y, Yang S, et al. Identification of a novel, tissue-specific ABCG2 promoter expressed in pediatric acute megakaryoblastic leukemia[J]. *Leuk Res*, 2011, 35(10): 1321-1329.

(张蕾 编辑)

致作者信

尊敬的作者、读者：

最近有不法分子利用《中国现代医学杂志》假网站假邮箱诱使作者投稿、约稿，诈取版面费或者加快费，同时通过不正当手段将假网站置顶百度搜索结果前几名，请大家不要向假网站及邮箱投稿。本刊从不向作者发电子版的录用通知，除审稿费和版面费外不收加快费，凡是大家收到电子版的盖有《中国现代医学杂志》假公章的《录用通知》都是假的，更不要寄版面费和加快费。《中国现代医学杂志》投稿路径一：《中国现代医学杂志》官网 www.zgxdyx.com；投稿路径二：进入中南大学湘雅医院官网→首页左下角点击“医学杂志”→点击《中国现代医学杂志》→点击《中国现代医学杂志》官网 <http://www.zgxdyx.com>。请大家提高警惕，不要上当受骗，造成不必要的损失。任何事情请来电咨询。编辑部咨询电话：0731-84327993（咨询时间上午 8:00 ~ 12:00，下午 2:30 ~ 5:30）。

《中国现代医学杂志》编辑部