

同源盒基因 HOXA9 在儿童急性白血病中的表达及其临床意义

贾秀红 朱立平 李建厂 王翠翠

(滨州医学院附属医院儿科,山东 滨州 256603)

[摘要] 目的 研究同源盒基因 HOXA9 在儿童急性白血病(AL)患儿骨髓单个核细胞中的表达,并探讨其临床意义。方法 采用 RT-PCR 方法检测 46 例不同时期 AL 患儿 HOXA9 mRNA 的表达水平,以 15 例特发性血小板减少性紫癜(ITP)患儿作为对照。结果 46 例 AL 患儿(52 份骨髓标本)HOXA9 基因阳性表达率为 63%,其中急性髓细胞白血病(AML)组阳性表达率(86%)明显高于急性淋巴细胞白血病(ALL)组(35%)及对照组(13%) ($P<0.05$); AML 组 HOXA9 mRNA 表达水平明显高于 ALL 组及对照组 ($P<0.05$)。HOXA9 在各型儿童 AML 中表达不同,mRNA 相对表达水平依次为:M5 型>M4 型>M1 和(或)M2 型,而在 M3 型中未检测到表达。HOXA9 在 AML 患儿高危组中的阳性表达水平较高。AML 患儿初治组 HOXA9 基因阳性表达率及 mRNA 水平明显高于缓解组和对照组 ($P<0.05$),而缓解组与对照组比较差异无统计学意义;未缓解组 HOXA9 基因表达显著高于缓解组和对照组 ($P<0.05$)。结论 HOXA9 基因高表达与 AL 的发生相关;AML 患儿 HOXA9 基因表达水平明显高于 ALL 患儿。HOXA9 基因高表达者与白血病危险程度有关,且提示预后不良。因此,HOXA9 基因有望成为儿童 AL 诊断、治疗及判断预后的一个靶点。

[中国当代儿科杂志,2013,15(4):268–272]

[关键词] HOXA9 基因;急性白血病;儿童

Expression of homeobox gene HOXA9 in childhood acute leukemia, and its clinical significance

JIA Xiu-Hong, ZHU Li-Ping, LI Jian-Chang, WANG Cui-Cui. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou, Shandong 256603, China (Email: jiaxiuhong001@163.com)

Abstract: Objective To investigate the expression of homeobox gene HOXA9 in the bone marrow mononuclear cells of children with acute leukemia (AL) and its clinical significance. **Methods** Forty-six children with AL were divided into acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL) groups. Fifteen children with idiopathic thrombocytopenic purpura were selected as a control group. The mRNA expression of HOXA9 was measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** HOXA9 expression was detected in 63% of the 52 bone marrow samples from 46 AL children. The positive HOXA9 expression rate in the AML group was significantly higher than in the ALL and control groups (86% vs 35% and 13%; $P<0.05$). The mRNA expression of HOXA9 in the AML group was significantly higher than in the ALL and control groups ($P<0.05$). Among the children with AML, those with M5 AML had the highest HOXA9 mRNA level, followed by children with M4 AML and children with M1 and/or M2 AML, but HOXA9 expression was not detected in children with M3 AML. The high-risk subgroup of AML children had relatively high levels of HOXA9 expression. In the children with AML, the initial treatment subgroup had significantly higher positive HOXA9 expression rate and HOXA9 mRNA levels than in the remission subgroup and control group ($P<0.05$), but there were no significant differences between the latter two groups ($P>0.05$). The non-remission subgroup had significantly higher HOXA9 expression than the remission subgroup and control group ($P<0.05$). **Conclusions** High expression of HOXA9 is associated with the occurrence of AL, and its expression level is significantly higher in children with AML than in those with ALL. There is a positive correlation between the expression level of HOXA9 and the risk of childhood leukemia, and high expression of HOXA9 suggests poor prognosis. Therefore, HOXA9 can be used as one of the indices in the diagnosis, treatment and prognosis prediction of childhood AL.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(4):268–272]

Key words: HOXA9 gene; Acute leukemia; Child

[收稿日期]2012–08–26;[修回日期]2012–10–08
[基金项目]山东省科学技术发展计划(2010GSF10264);山东省自然科学基金资助项目(Y2007C018)。
[作者简介]贾秀红,女,硕士,主任医师,教授。

同源盒基因(Homeobox Gene, HOX 基因)是一类控制胚胎发育和细胞分化的调节基因。HOXA9 基因属于 A 簇同源盒基因,位于人类 7 号染色体短臂(7p15-p14),是一种重要的转录调节因子,与白血病的发生密切相关^[1]。HOXA9 在早期形成造血祖细胞及促进造血干细胞分化中高表达,是导致白血病最常见的变异基因之一^[2]。国内对 HOXA9 表达与儿童急性白血病(acute leukemia, AL)关系及相关研究的报道鲜见。本研究采用逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)对 AL 患儿骨髓单个核细胞 HOXA9 基因的表达进行检测,探讨儿童 AL 中 HOXA9 基因表达规律与临床 AL 治疗及预后的相关性,以望为临床靶向基因治疗儿童白血病、改善预后提供新的线索。

1 资料与方法

1.1 临床材料

收集 2009 年 9 月至 2011 年 12 月间确诊为 AL 患儿 46 例,骨髓标本 52 份,其中男性 25 例,女性 21 例,年龄 10 个月至 13 岁 6 个月,中位年龄 5 岁 10 个月。根据白血病 MICM(形态学、免疫学、细胞遗传学和分子生物学)分型,骨髓标本分为急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML) 29 份(M1 3 例, M2 6 例, M3 4 例, M4 7 例, M5 9 例),急性淋巴细胞性白血病(acute lympholastic leukemia, ALL) 23 份。另选取对照组 15 例,其中男 9 例,女 6 例,年龄 11 个月至 10 岁 6 个月,中位年龄 4 岁 9 个月,均为免疫性血小板减少症(ITP)患儿。样本的采集均征得患儿家长同意。

根据标本采集时期和 AL 早期治疗反应评判标准,分为初治组、缓解组和未缓解组,具体见表 1。初治组指确诊为 AL 但未经治疗的患儿;缓解组指常规联合化疗 1 个疗程达缓解者;未缓解组指至少常规联合化疗 1 个疗程未达到缓解者。初治组 37 例患儿(37 份骨髓标本),AML 采用 DAE(柔红霉素、阿糖胞苷、依托泊苷)治疗方案化疗,其中 M3 型采用全反式维甲酸(ATRA)联合柔红霉素(DNR)治疗;ALL 采用 VDLD(长春新碱、柔红霉素、左旋门冬酰胺酶、地塞米松)治疗方案化疗。缓解组 7 例患儿共收集到 12 份骨髓标本,未缓解组 2 例患儿共收集到 3 份骨髓标本。

1.2 主要试剂

人淋巴细胞分离液(天津 TBD 公司);人急性单核细胞白血病细胞株 U937(上海中国科学院细胞库);RPMI-1640、胎牛血清(美国 Hyclone 公司);RNA 提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司);

RT-PCR 试剂盒及 HOXA9、 β -actin 引物(日本 TaKa-Ra 公司)。

表 1 52 份骨髓标本 MICM 分型诊断和分组 (份)

骨髓标本	初治组	缓解组	未缓解组	总计
AML	20	7	2	29
ALL	17	5	1	23
合计	37	12	3	52

1.3 实验方法

1.3.1 U937 细胞培养 用 10% 胎牛血清,终浓度为 10 万 U/L 青霉素及链霉素的 RPMI-1640 培养液,于 37℃、5% CO₂、饱和湿度细胞培养箱中培养 U937 细胞。细胞呈悬浮状态,生长良好,2~3 d 换液并传代 1 次,选取处于对数生长期的细胞,计数在 1×10⁶,提取总 RNA 进行 RT-PCR,作为检测标本的阳性对照。

1.3.2 标本制备 常规骨髓穿刺抽吸 2 mL 骨髓标本,注入含 EDTA 抗凝的 20 mL 试管内,采用人淋巴细胞分离液分离各份骨髓单个核细胞。室温下加入 2 mL 生理盐水稀释标本,向离心管内加入 2 mL 人淋巴细胞分离液,然后将离心管倾斜 45°,沿管壁缓慢加入稀释的骨髓液,保持两界面清晰,水平离心机 2000 r/min 离心 30 min 后可见分层,无菌吸取中间的白膜层于另一离心管内,加入 5 倍体积的生理盐水充分混匀,1000 r/min 离心 10 min,连续洗涤细胞两次。常规冻存备用。

1.3.3 RNA 提取与鉴定 按试剂盒说明书冰上提取细胞总 RNA,离心吸附柱纯化 RNA,溶于 RNase Free 水,紫外分光光度计测定样品吸光度 A260/A280 比值,介于 1.8~2.2,测定样本中总 RNA 浓度。

1.3.4 逆转录及 PCR 反应 按 RT-PCR 试剂盒说明书操作。单链 cDNA 合成反应条件为:37℃ 15 min,85℃ 5 s,共 1 个循环。由 Primer Premier 软件设计并合成 HOXA9 引物序列:正义链 5'-TGTC-CCTGACTGACTATGCTTG-3',反义链 5'-TGCTCG-GTCTTTGTTGATTTT-3',片段长度 353 bp;内参照 β -actin 正义链 5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3',反义链 5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3',片段长度 268 bp。反应条件为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 60 s,共进行 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。

1.3.5 半定量 PCR 产物 PCR 产物经含核酸染料的 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,100 V 电压下电泳

40 min,采集图像,阳性结果示 268 bp 及 353 bp 处各有一亮带,分别为 β -actin 及 HOXA9。经 Gel-Pro analyzer 软件分析图像,计算目的基因 mRNA 的相对表达水平。HOXA9 mRNA 相对表达水平(ODR) = HOXA9 灰度值/ β -actin 灰度值 $\times 100\%$ 。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件处理数据,样本率比较采用 χ^2 检验;计量资料结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HOXA9 基因在 AL 患儿及对照组中的表达情况

46 例 AL 患儿中白血病细胞 HOXA9 阳性表达率为 63% (33/52),其中 AML 患儿 HOXA9 阳性表达率最高(86%),明显高于 ALL 组(35%)及对照组(13%) (分别 $\chi^2 = 14.63, 22.15$,均 $P < 0.05$),而 ALL 组与对照组比较差异无统计学意义($\chi^2 = 2.15, P > 0.05$)。

HOXA9 mRNA 在对照组及 AL 患儿骨髓中表达水平不同,AML 组 HOXA9 mRNA 表达水平明显高于对照组及 ALL 组(分别 $q = 5.098, 7.424$,均 $P < 0.01$),而 ALL 组与对照组相比差异无统计学意义($q = 0.924, P > 0.05$)。U937 细胞高表达 HOXA9,在 353 bp 处明显可见一亮带。各组 β -actin 的表达水平基本相同。见表 2 和图 1。

2.2 HOXA9 表达水平与 AML 亚型的关系

将 AML 患儿按照 FAB 分型分各种亚型,研究 HOXA9 mRNA 表达水平在 AML 各亚型之间的分布规律。结果显示:AML 患者 HOXA9 各型表达水平

存在差异($F = 53.74, P < 0.05$),其中 M5 型 HOXA9 mRNA 的表达水平最高,M4 型次之,而 M3 型未检测到 HOXA9 表达,M1 型与 M2 型 HOXA9 mRNA 表达水平较低且差异无统计学意义。见表 3 和图 1。

表 2 各组骨髓 HOXA9 mRNA 的表达情况

组别	<i>n</i>	HOXA9 mRNA 阳性率 [例(%)]	HOXA9 mRNA ($\bar{x} \pm s$)
对照组	15	2(13)	0.085 $\pm$ 0.016
AML 组	29	25(86) ^a	0.462 $\pm$ 0.161 ^a
ALL 组	23	8(35) ^b	0.159 $\pm$ 0.062 ^b
<i>F</i> /(χ^2) 值		(24.94)	18.06
<i>P</i> 值		<0.05	<0.01

a:与对照组比较, $P < 0.01$;b:与 AML 组比较, $P < 0.05$

2.3 AML 患儿 HOXA9 基因表达水平与化疗效果的关系

初治组与对照组及缓解组患儿 HOXA9 阳性率比较差异有统计学意义(分别 $\chi^2 = 23.819, 5.888$,均 $P < 0.05$),而缓解组与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 4。

表 3 AML 各亚型 HOXA9 mRNA 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

FAB 分型	<i>n</i>	HOXA9 表达水平
M1	3	0.244 $\pm$ 0.029
M2	6	0.293 $\pm$ 0.041
M4	7	0.498 $\pm$ 0.070 ^a
M5	9	0.621 $\pm$ 0.063 ^{a,b}
<i>F</i> 值		53.74
<i>P</i> 值		<0.05

a:与 M1 和 M2 型比较, $P < 0.05$;b:与 M4 型比较, $P < 0.05$

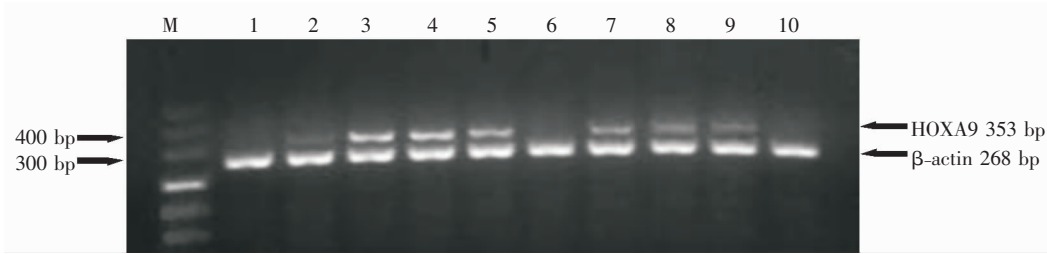


图 1 RT-PCR 法检测 HOXA9 基因在各组的表达情况 注:M:500 bp Marker;1~2:对照组;3:U937 细胞;4~8:AML 组,分别为 M5、M4、M3、M2、M1;9~10:ALL 组。

化疗效果因 HOXA9 在各组表达水平不同而存在差异,初治组 HOXA9 mRNA 相对表达水平较高,经化疗缓解后 HOXA9 mRNA 平均表达水平降低,而未缓解组 HOXA9 mRNA 表达水平仍较高(0.638 $\pm$ 0.024)。初治组 HOXA9 相对表达水平高于对照组与

缓解组(分别 $q = 6.174, 5.046$,均 $P < 0.05$),与未缓解组比较差异无统计学意义($q = 2.258, P > 0.05$)。未缓解组表达水平高于对照组和缓解组(分别 $q = 6.268, 5.143$,均 $P < 0.05$),缓解组与对照组比较差异无统计学意义($q = 2.095, P > 0.05$)。见表 4 和图 2。

表 4 HOXA9 阳性表达与化疗效果的关系

组别	例数	HOXA9 阳性率 [例(%)]	HOXA9 ($\bar{x} \pm s$)
对照组	15	2(13)	0.085 $\pm$ 0.016
初治组	20	19(95) ^{a, b}	0.490 $\pm$ 0.140 ^{a, b}
缓解组	7	4(57)	0.245 $\pm$ 0.023
未缓解组	2	2(100) ^{a, b}	0.638 $\pm$ 0.024 ^{a, b}
$F/(\chi^2)$ 值		24.87	11.33
P 值		<0.05	<0.05

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与缓解组比较, $P < 0.05$

2.4 AML 患儿 HOXA9 阳性表达率与危险分组的
关系

根据儿童 AML 诊疗建议^[3](低危组: M3、M2b
及伴 inv16 染色体改变, 高危组: 存在预后相关的危
险因素中任何一项, 中危组: 非低危及无相关危险因

素), AML 分为低危组 11 份骨髓标本, 中危组 10 份
骨髓标本, 高危组 8 份骨髓标本。结果显示高危组、
中危组、低危组 AML 患儿 HOXA9 表达阳性率分别
为 100%、90%、73%, 对应 HOXA9 mRNA 相对表达
水平分别为 0.60 $\pm$ 0.10、0.47 $\pm$ 0.13、0.32 $\pm$ 0.12,
高危组 HOXA9 mRNA 相对表达水平高于低危组及
中危组($P < 0.05$), 见表 5。

表 5 HOXA9 阳性表达与儿童 AML 危险分组的
关系

组别	例数	HOXA9 阳性率 [例(%)]	HOXA9 ($\bar{x} \pm s$)
低危组	11	8(73)	0.32 $\pm$ 0.12
中危组	10	9(90)	0.47 $\pm$ 0.13
高危组	8	8(100)	0.60 $\pm$ 0.10 ^{a, b}
$F/(\chi^2)$ 值		(2.98)	11.52
P 值		>0.05	<0.05

a: 与低危组比较, $P < 0.05$; b: 与中危组比较, $P < 0.05$

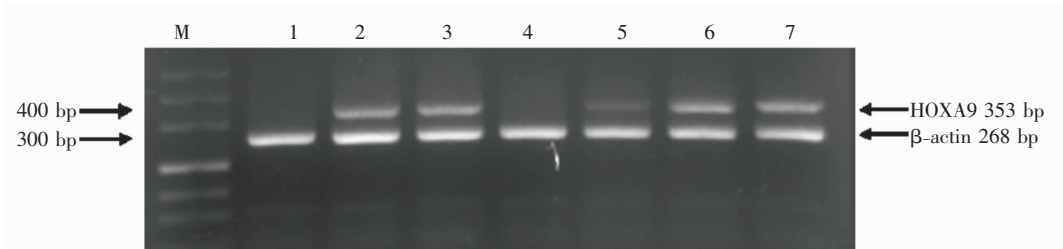


图 2 RT-PCR 法检测 HOXA9 基因在各组的表达情况 注: M: 500 bp Marker; 1: 对照组; 2 ~ 3: 初治组; 4 ~ 5: 缓解组; 6 ~ 7: 未缓解组。

3 讨论

AML 的发病率占 AL 的四分之一, 死亡率超过
AL 的二分之一^[4]。随着研究的进展, 越来越多的指
标可以预测其治疗效果及预后。目前研究 AML 患
者中基因改变特点成为研究热点。HOX 基因转录
因子在调节造血系统中起重要的作用, 其表达异常
可导致白血病的发生。本研究从阳性率及 mRNA
水平上检测 HOXA9 在各组的表达情况。结果显
示, HOXA9 基因在儿童 AL 中呈高表达, 总表达率
为 63%, 其中在 AML 组患儿中 HOXA9 阳性率及表
达水平均明显高于 ALL 组及对照组, 而 ALL 组与对
照组比较差异无统计学意义。Niimi 等^[5] 在儿童的
ALL 患者的过表达基因中未检测到 HOXA9 基因,
本研究结果与之相似, 提示 HOXA9 异常高表达与
儿童 AL 的发病有密切关系, 在 AML 中表达水平明
显高于 ALL。

进一步研究 HOXA9 mRNA 表达水平在 AML 各
亚型之间的分布规律表明: HOXA9 在儿童各型

AML 中表达水平存在差异, 其 mRNA 相对表达水平
依次为: M5 型 > M4 型 > M1 和 (或) M2 型, 其中在
M3 型中未检测到表达。M5 型、M4 型、M1 和 (或)
M2 型之间相比较差异均有统计学意义, 而 M1 型与
M2 型 HOXA9 mRNA 表达水平相比差异无统计学
意义。Casas 等^[6] 通过 RT-PCR 方法分析了 41 例成
人 AML 患者中 HOXA9、DEK、CBL 及 CSF1R 基因
的表达, 显示 HOXA9 在 AML 中表达在 78% 情况
下表现为过表达, 15% 机率沉默; 同时骨髓检测发
现在 M2 型中 HOXA9 表达较低。本研究 AML 患
儿 HOXA9 表达除了 M3 型, 均表现为表达增高, 分
析其差异是否与样本数量有限及分布有关, 或由于
儿童造血系统发育程度与成人不同, 有待进一步
的研究。有研究报道在 M3 型中 PML 与 RARa 基
因融合成分化阻滞的 PML-RARa 融合基因, 而维
甲酸可诱导 PML-RARa 分化, 下调 HOXA9 基因
表达, 提示 HOXA9 在 M3 型中表达下降可能与
PML-RARa 融合基因有关^[7]; 在一定程度上解释
了本研究中的 4 例 M3 型均不表达 HOXA9。此外,
HOXA9 基因的表达情况与儿童 AML 的危险程度
存在一定关系, 其

AML 危险性越高,HOXA9 表达水平越高,提示 HOXA9 表达水平可作为 AML 危险程度的依据之一。

目前化疗仍是治疗 AML 主要方法,而白血病细胞对化疗药物产生多药耐药是导致化疗失败的主要原因^[8]。其产生耐药的机制之一是白血病细胞抗凋亡能力增加,对药物的敏感性下降而降低化疗效果而影响预后。本课题组前期在 U937(人白血病急性单核细胞株)细胞中利用 siRNA 干扰 HOXA9 基因对其耐药性进行了研究,提示沉默 HOXA9 基因可逆转肿瘤细胞对化疗药物的耐药,提高对药物的敏感性,从而促进细胞凋亡^[9]。本研究发现:化疗前后患儿中白血病细胞表达 HOXA9 阳性率有差异,初治组、缓解组、未缓解组患儿中表达 HOXA9 阳性率分别为 95%、57% 和 100%;半定量结果显示:3 组 HOXA9 mRNA 相对表达水平由高到低依次为未缓解组、初治组和缓解组;说明在 AL 患儿中无论从阳性率还是从 HOXA9 mRNA 相对表达水平,初治组和未缓解组均明显高于缓解组和对照组,而缓解组和对照组比较差异无统计学意义;提示高表达 HOXA9 基因的 AML 患儿预后不良,与 Starkova 等^[10]的研究一致。分析其原因可能由于在初治组和未缓解组 HOXA9 表达水平高,抑制白血病细胞凋亡,增加细胞耐药,但其作用机制仍需进一步研究。有研究 HOX 基因处于低水平对 AML 治疗有益,其中 HOXA9 基因低表达是患者临床缓解和治疗敏感最佳的检测指标^[11]。HOXA9 基因可能与化疗耐药有关,表达水平与生存和治疗效果呈负相关,在一定程度上可作为判断化疗效果的“预后因子”。

[参 考 文 献]

[1] Borrow J, Shearman AM, Stanton VP Jr, Becher R, Collins T,

Williams AJ, et al. The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9[J]. Nat Genet, 1996, 12(2): 159-167.

[2] Huang Y, Sitwala K, Bronstein J, Sanders D, Dandekar M, Collins C, et al. Identification and characterization of Hoxa9 binding sites in hematopoietic cells[J]. Blood, 2012, 119(2):388-398.

[3] 中华医学会儿科学分会血液学组,中华儿科杂志编辑委员会. 儿童急性髓细胞白血病诊疗建议[J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(11): 877-878.

[4] Meshinchi S, Arceci RJ. Prognostic factors and risk-based therapy in pediatric acute myeloid leukemia[J]. Oncologist, 2007, 12(3): 341-355.

[5] Niini T, Vettenranta K, Hollmén J, Larramendy ML, Aalto Y, Wikman H, et al. Expression of myeloid-specific genes in childhood acute lymphoblastic leukemia-a cDNA array study[J]. Leukemia, 2002, 16(11): 2213-2221.

[6] Casas S, Nagy B, Elonen E, Aventín A, Larramendy ML, Sierra J, et al. Aberrant expression of HOXA9, DEK, CBL and CSF1R in acute myeloid leukemia[J]. Leuk Lymphoma, 2003, 44(11): 1935-1941.

[7] Thompson A, Quinn MF, Grimwade D, O'Neill CM, Ahmed MR, Grimes S, et al. Global down-regulation of HOX gene expression in PML-RARalpha⁺ acute promyelocytic leukemia identified by small-array real-time PCR[J]. Blood, 2003, 101(4): 1558-1565.

[8] Long J, Parkin B, Ouillette P, Bixby D, Shedden K, Erba H, et al. Multiple distinct molecular mechanisms influence sensitivity and resistance to MDM2 inhibitors in adult acute myelogenous leukemia[J]. Blood, 2010, 116(1): 71-80.

[9] 朱立平,贾秀红,李建厂,韩兆东. RNA 干扰沉默 HOXA9 基因逆转 U937 细胞多药耐药[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 15(27):1170-1173.

[10] Starkova J, Zamostna B, Mejstrikova E, Krejci R, Drabkin HA, Trka J. HOX gene expression in phenotypic and genotypic subgroups and low HOXA gene expression as an adverse prognostic factor in pediatric ALL[J]. Pediatr Blood Cancer, 2010, 55(6): 1072-1082.

[11] Andreeff M, Ruvalo V, Gadgil S, Zeng C, Coombes K, Chen W, et al. HOX expression patterns identify a common signature for favorable AML[J]. Leukemia, 2008, 22(11): 2041-2047.

(本文编辑:王庆红)