

论著·临床研究

SIRT1在急性髓系白血病患者骨髓活检组织中的表达及临床意义

刘晓明¹ 周剑峰¹ 张培红² 阮敏¹ 张丽¹ 邹尧¹ 陈玉梅¹ 竺晓凡¹

(中国医学科学院、北京协和医学院血液病医院/血液学研究所

1. 儿童血液病诊疗中心; 2. 病理中心, 天津 300020)

[摘要] **目的** 了解 SIRT1 在急性髓系白血病 (AML) 患儿骨髓活检组织中的表达水平, 并分析其与 AML 预后的相关性。**方法** 回顾性分析 2009 年 7 月至 2012 年 4 月确诊为 AML 并于初诊时行骨髓活检检查的 54 例患儿的临床资料。采用免疫组织化学染色方法检测患儿骨髓活检组织中 SIRT1 的表达; 根据 SIRT1 的表达情况将病例分为 SIRT1 阴性组 ($n=10$) 和 SIRT1 阳性组 ($n=44$), 再根据 SIRT1 表达的阳性程度进一步将 SIRT1 阳性组分为 (+) 组 ($n=8$)、(2+) 组 ($n=7$) 和 (3+) 组 ($n=29$), 比较各组患儿的预后。Cox 多因素回归分析患儿长期生存的危险因素。**结果** SIRT1 (3+) 组病死率明显高于 SIRT1 阴性组 ($P<0.05$)。SIRT1 阳性组 2 年总生存率低于 SIRT1 阴性组 ($P<0.05$); 2 年无事件生存率亦低于 SIRT1 阴性组 ($P<0.05$)。Cox 多因素回归分析显示 SIRT1 阳性表达不利于患儿的长期生存 ($P=0.045$, 危险系数绝对值 $=2.071$, 95%CI: 1.017~4.219)。**结论** 部分 AML 患儿骨髓活检组织存在 SIRT1 表达增高情况, 且 SIRT1 高表达与不良预后相关。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(6): 614-618]

[关键词] 急性髓系白血病; 预后; SIRT1; 儿童

Expression of SIRT1 in bone marrow biopsy tissues and its clinical significance among children with acute myeloid leukemia

LIU Xiao-Ming, ZHOU Jian-Feng, ZHANG Pei-Hong, RUAN Min, ZHANG Li, ZOU Yao, CHEN Yu-Mei, ZHU Xiao-Fan. Department of Pediatrics, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking University Medical College, Tianjin 300020, China (Zhu X-F, Email: xzfzhu1981@126.com)

Abstract: Objective To determine the expression level of silent mating-type information regulation 2 homologue 1 (SIRT1) in bone marrow biopsy tissues among children with acute myeloid leukemia (AML) and analyze its relationship with the prognosis of AML patients. **Methods** A retrospective analysis was performed on the clinical data of 54 children who were diagnosed with AML between July 2009 and April 2012 and who underwent bone marrow biopsy at diagnosis. The expression of SIRT1 in bone marrow was measured by immunohistochemistry. The 54 patients were divided into two groups according to the expression of SIRT1: SIRT1-negative ($n=10$) and SIRT1-positive ($n=44$). The SIRT1-positive group was further divided into three subgroups: SIRT1(+) ($n=8$), SIRT1(++) ($n=7$) and SIRT1(+++) ($n=29$) according to the expression levels of SIRT1. Cox multivariate regression analysis was used to determine the unfavorable factors for long survival in children with AML. **Results** The SIRT1(+++) subgroup had a significantly higher mortality than the SIRT1-negative group ($P<0.05$). Compared with the SIRT1-negative group, the SIRT1-positive group had a significantly lower 2-year overall survival rate ($P<0.05$) and a significantly lower 2-year event-free survival rate ($P<0.05$). Cox multivariate regression analysis showed that positive expression of SIRT1 was an unfavorable factor for long-term survival in children with AML, with a risk coefficient of 2.071 (95% CI: 1.017-4.219; $P=0.045$). **Conclusions** SIRT1 is overexpressed in some of pediatric AML patients, and the overexpression of SIRT1 is associated with poor prognosis.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(6): 614-618]

Key words: Acute myeloid leukemia; Prognosis; SIRT1; Child

[收稿日期] 2013-11-25; [接受日期] 2014-03-14

[基金项目] 科技部重大专项 (2011ZX09302-007-04); 天津市科技支撑计划 (12ZCDZSY18100)。

[作者简介] 刘晓明, 女, 硕士研究生, 主治医师。

[通信作者] 竺晓凡, 女, 主任医师。

急性髓系白血病(AML)是一组起源于造血干细胞的恶性克隆性疾病,由基因突变导致的细胞增殖、分化及凋亡途径改变是AML的发病基础。目前国际上依据初诊时的白细胞计数、年龄、细胞遗传学(染色体核型分析)检测结果等将其分为预后良好、预后中等及预后差3组^[1]。

SIRT1(silent mating-type information regulation 2 homologue 1)是Sirtuins去乙酰化酶家族中的一员,参与了众多基因转录、能量代谢以及细胞衰老过程的调节。目前的研究表明,SIRT1与肿瘤的发生发展有至关重要的作用。部分研究显示SIRT1在许多鼠以及人类肿瘤细胞中高表达,下调SIRT1的表达可引起相应肿瘤细胞的生长停止及凋亡^[2-3]。也有研究表明,SIRT1在许多肿瘤中的表达水平是降低的,在一定程度上抑制了肿瘤发生^[4]。

关于SIRT1在白血病领域的研究目前仍处于探索当中。研究显示:SIRT1低表达于正常成人造血干/祖细胞,但是在慢性粒细胞白血病造血干/祖细胞中的表达却是升高的^[5]。SIRT1的活化可以被bcr/abe酪氨酸激酶介导也可独立发生。SIRT1的活化促进慢性髓系白血病(CML)干细胞对酪氨酸激酶抑制因子拮抗,从而起到了后天获得的类似bcr/abe突变的拮抗作用^[5]。Bradbury等^[6]首先发现SIRT1在AML病人中表达升高。而关于SIRT1在AML中的表达情况及对预后的影响目前鲜有报道。本课题组前期研究发现除目前常见的染色体异常会影响AML患儿的预后外,一些尚未被列为诊断或分型标准的基因异常,如FLT3/TKD突变等也是儿童AML致病及预后的关键因素^[7]。那么SIRT1在儿童AML的致病及预后中又扮演了什么样的角色呢?为了解儿童AML中SIRT1的表达情况,本研究对54例初诊AML患儿骨髓活检组织中SIRT1的表达情况进行检测,并分析其与临床特征、疗效的相关性,报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2009年7月至2012年4月于中国医学科学院血液病医院儿童血液病诊疗中心初诊并行骨髓活检的54例AML患儿为研究对象,所有患儿均经骨髓形态学、细胞组织化学染色、细胞免

疫分型、分子生物学等确诊。其中男30例,女24例,年龄9.5岁(2~18岁)。该研究已取得患儿监护人知情同意。

1.2 诊断、危险度分组及疗效标准

参照1987年全国白血病化疗讨论会制定的白血病诊断标准^[8]并依据AML-99方案改良的CAMS-2009方案^[9]分型标准对患儿进行危险度分型。(1)低危组:伴t(8;21)且WBC $<50 \times 10^9/L$,伴inv16(p13q22),或年龄 <2 岁且无高危因素;(2)高危组:诱导治疗1疗程未达完全缓解(CR)或伴-7,5q-、t(16;21)、t(9;22)等;(3)中危组:无上述两组特征的患儿。疗效判断标准参照《血液病诊断和疗效标准》第3版^[10]。

1.3 治疗方案

所有进行治疗的非AML-M3患儿均采用根据AML-99方案改良的CAMS-2009方案^[9]进行治疗。A方案:依托泊甙(VP-16)、阿糖胞苷(Ara-C)和米托蒽醌(MTZ)组成单诱导方案,第6天三联鞘注;B方案:VP-16、Ara-C和去甲氧柔红霉素(IDA)组成的双诱导方案,第4天三联鞘注;C方案:VP-16、Ara-C和IDA组成的方案,第1天三联鞘注。其中年龄 <2 岁或WBC $<100 \times 10^9/L$ 的患儿采用A方案;年龄 >2 岁且WBC $>100 \times 10^9/L$ 的患儿采用B方案;1疗程治疗后骨髓象呈M3状态的患儿则进行C方案再诱导治疗。巩固治疗方案为4~6个含中、大剂量Ara-C组成的方案。

所有进行治疗的AML-M3患儿均采用如下方案:诱导治疗应用全反式维甲酸(ATRA)或三氧化二砷(As₂O₃)或二者联合应用,达CR后给予至少2疗程强化治疗,化疗方案为DA(柔红霉素+Ara-C)或MA(MTZ+Ara-C)或HA(高三尖杉酯碱+Ara-C),维持治疗采用全反式维甲酸(ATRA)联合6-巯基嘌呤(6-MP)和甲氨蝶呤(MTX),缓解期行腰穿加三联鞘注^[11]。

1.4 免疫组化法检测骨髓组织SIRT1蛋白表达

采用EnVision两步法进行免疫组化检测^[12]。兔抗人SIRT1抗体(克隆号E104)购于美国Abcam公司,工作浓度1:100;二抗快捷型酶标羊抗兔/兔IgG聚合物购于福州迈新公司。DBA显色剂购于北京中山金桥公司。石蜡标本4 μm 厚度连续切片,高压抗原修复,DBA显色。用已知阳性切片作为阳性对照,PBS代替一抗作为阴性对照。

SIRT1 蛋白定位于细胞核，阳性着色细胞核呈黄色或棕黄色。每例患儿骨髓组织标本随机选取 2 张切片，每张切片随机观察 10 个高倍视野，在无背景着色条件下用半定量积分法判断结果^[13]：

- (1) 黄色为 1 分，棕黄色为 2 分，棕褐色为 3 分；
- (2) 计数 10 个高倍视野，阳性细胞在同类细胞中所占百分率 <25% 为 0 分，25%~ 为 1 分，50%~ 为 2 分，≥ 75% 为 3 分。(3) 按照上述两项指标的分数乘积：0 分为阴性，1~3 分为弱阳性，4~6 分为阳性，7~9 分为强阳性。

1.5 分组

根据患儿骨髓活检组织中 SIRT1 蛋白的表达情况将病例分为 SIRT1 阴性组 (10 例) 和 SIRT1 阳性组 (44 例)；根据 SIRT1 表达的阳性程度不同进一步将 SIRT1 阳性组分为 (+) 组、(2+) 组和 (3+) 组。各组患儿性别、年龄、FAB 分型、

初诊白细胞计数、骨髓初诊幼稚细胞比例、融合基因、染色体等分布上差异均无统计学意义，见表 1。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用 *t* 检验；非正态分布的计量资料以中位数 (四分位间距) [*M* (*P*25, *P*75)] 表示，组间比较采用秩和检验；计数资料用例 (%) 表示，采用卡方检验比较组间差异。生存曲线采用 Kaplan-Meier 分析，多因素分析采用 Cox 回归分析，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。总生存 (OS) 期指自诊断到死亡或末次随访日期。无事件生存 (EFS) 期定义为自诊断到第 1 次事故 (包括复发、在 CR 期间的死亡，未达 CR 者 EFS 为 0) 或末次随访日期。随访时间截至 2013 年 6 月 31 日。

表 1 54 例患儿初诊时基本临床资料

临床资料	SIRT1 阴性组 (<i>n</i> =10)	SIRT1 阳性组			统计值	<i>P</i> 值
		(+) 组 (<i>n</i> =8)	(2+) 组 (<i>n</i> =7)	(3+) 组 (<i>n</i> =29)		
性别 [例 (%)]						
男	7(70)	4(50)	4(57)	15(52)	1.018	0.776
女	3(30)	4(50)	3(43)	14(48)		
年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	9 ± 6	12 ± 3	9 ± 4	9 ± 5	0.200	0.296
白细胞计数 ($\times 10^9/L$) [<i>M</i> (<i>P</i> 25, <i>P</i> 75)]	17.2(5.1, 29.5)	5.2(2.7, 36.3)	22.3(4.6, 30.0)	11.1(3.0, 28.1)	0.109	0.496
骨髓幼稚细胞计数 ($\bar{x} \pm s$, %)	57 ± 29	64 ± 32	69 ± 23	58 ± 23	0.219	0.708
FAB 分型 [例 (%)]						
M0	1(10)	0(0)	0(0)	3(10)	2.899	0.232
M1	0(0)	0(0)	0(0)	1(3)		
M2a	3(30)	2(25)	0(0)	0(0)		
M2b	2(20)	0(0)	3(43)	7(24)		
M3	1(10)	4(50)	0(0)	1(3)		
M4	1(10)	1(12)	0(0)	2(7)		
M4eo	0(0)	0(0)	0(0)	1(3)		
M5	2(20)	1(12)	3(43)	12(41)		
M6	0(0)	0(0)	1(14)	1(3)		
M7	0(0)	0(0)	0(0)	1(3)		
细胞遗传学特征 [例 (%)]						
t(8;21)	2(20)	1(12)	2(29)	4(14)	0.307	0.881
t(15;17)	1(10)	3(38)	0(0)	1(4)		
inv(16)	0(0)	0(0)	0(0)	1(4)		
复杂核型	0(0)	0(0)	0(0)	5(18)		
其他异常	0(0)	0(0)	2(29)	4(14)		
正常核型	7(70)	4(50)	3(43)	13(46)		
分子生物学特征 [例 (%)]						
AML1/ETO	2(20)	1(12)	3(43)	4(14)	0.016	0.665
PML/RARa	1(10)	3(38)	0(0)	1(4)		
CBFB/MYH11	0(0)	0(0)	0(0)	1(4)		
MLL	0(0)	0(0)	0(0)	4(14)		
FLT3/TKD	1(10)	1(12)	1(14)	1(4)		
NPM1	1(10)	0(0)	0(0)	0(0)		
CEBPA	1(10)	1(12)	1(14)	1(4)		
FLT3/ITD	1(10)	1(12)	1(14)	2(7)		

2 结果

2.1 各组患儿 SIRT1 表达的比较

病理组织骨髓活检显示, SIRT1 阴性组所有有核细胞均未着色; SIRT1 阳性(+)组、(2+)组和(3+)组细胞胞核均染色成黄棕色, 着色深度由黄棕色至棕褐色依次加深, 着色细胞比例由少至多。见图1。

2.2 各组患儿疗效比较

54例患儿中有10例失访, 44例可评价, 总缓解率为75%(33/44), 复发率为21%(7/33), 病死率为32%(14/44)。SIRT1 阴性组10例患儿中, 2例失访, 8例可评价, 缓解率为87%(7/8), 复发率和病死率均为0。SIRT1 阳性组44例患儿中, 9例失访, 35例可评价, 缓解率为71%(25/35), 复发率为28%(7/25), 病死率为37%(13/35)。(+)组8例患儿中, 无失访, 缓解率为87%(7/8), 复发率为14%(1/7), 病死率为12%(1/8); (2+)组7例患儿中, 1例失访, 6例可评价, 缓

解率为83%(5/6), 复发率为60%(3/5), 病死率为50%(3/6); (3+)组29例患儿中, 失访8例, 21例可评价, 缓解率为62%(13/21), 复发率为23%(3/13), 病死率为43%(9/21)。SIRT1 阴性组、SIRT1 阳性组及其各亚组间在缓解率、复发率上差异均无统计学意义(均 $P>0.05$); 仅 SIRT1 阴性组病死率明显低于(3+)组($P<0.05$)。

2.3 两组患儿生存分析结果

SIRT1 阴性组2年OS率(100%)高于SIRT1 阳性组[(44.9±15.5)%, $P=0.048$](图2); SIRT1 阴性组2年EFS率(100%)高于SIRT1 阳性组[(53.0±9.0)%, $P=0.033$], 见图3。

2.4 Cox 多因素回归分析

在排除了性别、年龄、FAB分型、初诊时外周血白细胞计数、初诊时骨髓幼稚细胞比例、染色体、融合基因等影响因素的影响后, 仅 SIRT1 阳性表达水平不利于患儿的长期生存($P=0.045$, 危险系数绝对值=2.071, 95%CI: 1.017~4.219)。

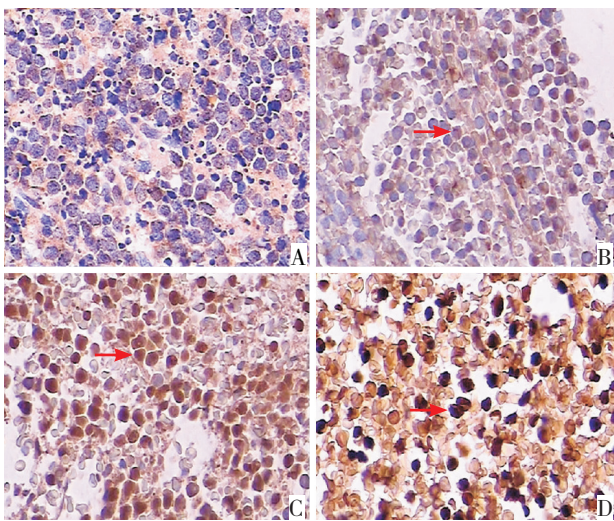


图1 SIRT1 骨髓活检病理组织免疫组织化学染色($\times 400$, DBA显色) A: SIRT1 阴性组, 有核细胞均未着色; B~D为SIRT1 阳性组, 其中B为(+)组, C为(2+)组, D为(3+)组。(+)组阳性细胞胞核染色成棕色; (2+)组阳性细胞胞核染色为棕色, 每个高倍镜视野着色细胞比例高于(+)组; (3+)组阳性细胞胞核染色成棕黑色, 每个高倍镜视野着色细胞比例高于(2+)组。箭头所指为SIRT1 阳性细胞。

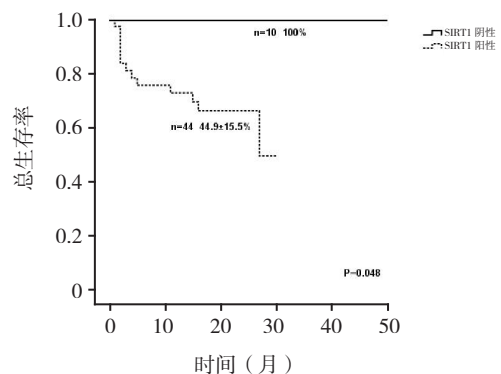


图2 SIRT1 阴性与阳性患儿2年总生存分析

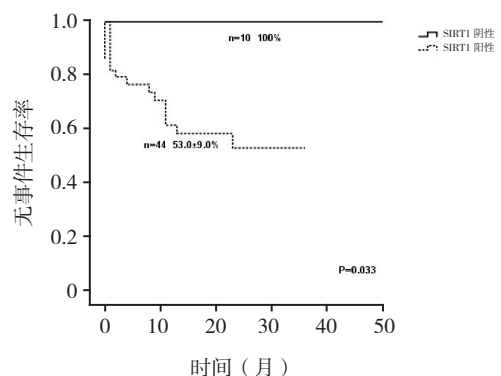


图3 SIRT1 阴性与阳性患儿2年无事件生存分析

3 讨论

SIRT1广泛表达于胎儿及成人组织中,其生理功能涉及基因转录沉默、细胞生长周期调节、能量代谢、血管生成、神经保护及细胞衰老等。SIRT1通过对染色质结构、染色质重塑和基因表达的决定作用来影响不同的细胞过程^[14]。

本研究共检测54例AML患儿骨髓活检组织中SIRT1蛋白的表达情况,其中有44例(82%)SIRT1表达阳性,进一步对这54例患儿临床治疗情况及预后随访进行研究后发现,SIRT1阴性患儿的预后普遍优于SIRT1阳性患儿,生存分析显示:SIRT1阴性组无论是在2年OS还是2年EFS均明显高于SIRT1阳性组。Cox多因素回归分析方法检测也显示:在排除了性别、年龄、FAB分型、初诊时外周血白细胞计数、初诊时骨髓幼稚细胞比例、染色体、融合基因等影响因素的影响后,SIRT1阳性仍是不利于患儿的长期生存的独立因素。上述结果提示:高表达的SIRT1在儿童AML的发生发展中很可能扮演了促进肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤细胞凋亡的作用。本研究结果跟目前国际上报道的关于SIRT1在CML耐药复发过程中所起的作用基本一致。Yuan等^[15]报道:对于原发性或继发性耐药的CML细胞,酪氨酸激酶抑制剂显得有些无能为力,研究其分子生物学特征,发现该部分细胞多高表达SIRT1,提示SIRT1的高表达对于CML的耐药起到了一定的作用。Li等^[16]同样发现:酪氨酸激酶抑制剂对于CML中静止期的白血病干细胞作用非常有限,而这些静止期的白血病干细胞上检测出有高表达的SIRT1,应用SIRT1抑制剂或敲除SIRT1基因后,CML小鼠体内或体外的静止期CML白血病细胞均加速凋亡。O'Hare等^[17]同样在CML的靶向治疗中提到了SIRT1的重要作用。

综上所述,SIRT1在半数以上AML患儿骨髓活检组织表达,且高表达与AML患儿不良预后相关。但由于儿童活检存在技术难度,本研究样本量有限,有必要进行大样本量临床验证,为儿童AML寻找有意义的预测预后的分子标志。

[参考文献]

- [1] Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes[J]. *Blood*, 2009, 114(5): 937-951.
- [2] Huffman DM, Grizzle WE, Bamman MM, et al. SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(14): 6612-6618.
- [3] Stunkel W, Peh BK, Tan YC, et al. Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer[J]. *Biotechnol J*, 2007, 2(11): 1360-1368.
- [4] Firestein R, Blander G, Michan S, et al. The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth[J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(4): e2020.
- [5] Chen W, Bhatia R. Roles of SIRT1 in leukemogenesis[J]. *Curr Opin Hematol*, 2013, 20(4): 308-313.
- [6] Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, et al. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors[J]. *Leukemia*, 2005, 19(10): 1751-1759.
- [7] 阮敏,王雅琴,张丽,等. 儿童急性髓系白血病FLT3突变临床分析:单中心研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2011, 13(11): 863-866.
- [8] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 第3版. 北京:科学出版社, 2007: 19-23.
- [9] Tsukimoto I, Tawa A, Horibe K, et al. Risk-stratified therapy and the intensive use of cytarabine improves the outcome in childhood acute myeloid leukemia: the AML99 trial from the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(24): 4007-4013.
- [10] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 第3版. 北京:科学出版社, 2007: 103-116.
- [11] Zhang L, Zhu X, Zou Y, et al. Effect of arsenic trioxide on the treatment of children with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia in China[J]. *Int J Hematol*, 2011, 93(2): 199-205.
- [12] Knabe C, Kraska B, Koch C, et al. A method for immunohistochemical detection of osteogenic markers in undecalcified bone sections[J]. *Biotech Histochem*, 2006, 81(1): 31-39.
- [13] 王泰龄,黄受方,李维华,等. 《全国免疫组织化学技术与诊断标准化专题研讨会》会议纪要[J]. *中华病理学杂志*, 1996, 25(6): 7-9.
- [14] Knight JR, Milner J. SIRT1, metabolism and cancer[J]. *Curr Opin Oncol*, 2012, 24(1): 68-75.
- [15] Yuan H, Wang Z, Li L, et al. Activation of stress response gene SIRT1 by BCR-ABL promotes leukemogenesis[J]. *Blood*, 2012, 119(8): 1904-1914.
- [16] Li L, Wang L, Wang Z, et al. Activation of p53 by SIRT1 inhibition enhances elimination of CML leukemia stem cells in combination with imatinib[J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(2): 266-281.
- [17] O'Hare T, Zabriskie MS, Eiring AM, et al. Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(8): 513-526.

(本文编辑: 万静)