

·论著·

儿童急性淋巴细胞白血病 DNA 倍性与体内白血病细胞凋亡

高怡瑾, 吴玥, 吴长根

(复旦大学儿科医院血液科, 上海 200032)

[摘要] 目的 探讨儿童急性淋巴细胞白血病(急淋)肿瘤细胞 DNA 倍性与凋亡间的关系。方法 检测 22 例初治急淋患儿的 DNA 倍性及化疗前后体内白血病细胞的凋亡情况。结果 化疗前所有患儿体内白血病细胞均无明显凋亡, 化疗后 DNA 指数为 1.16~1.6 的高二倍体组凋亡细胞比例为 $(22.06 \pm 8.98)\%$, 较非高二倍体组 $(9.38 \pm 10.27)\%$ 显著升高 ($P < 0.01$)。结论 儿童高二倍体急性淋巴细胞白血病预后优于其它 DNA 倍性的病人与此类白血病细胞易凋亡、对化疗敏感有关。

[关键词] 急性白血病; 凋亡; 细胞周期; 流式细胞仪; 儿童

[中图分类号] R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)06-0627-03

DNA Ploidy and Apoptosis in Vivo in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia

GAO Yi-Jin, WU Yue, WU Chang-Gen

Department of Hematology, Children's Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: **Objective** To explore the relationship between DNA ploidy and apoptosis in vivo in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Methods** Using flow cytometry, the assay of apoptosis of bone marrow lymphoblasts of 22 children with recent onset ALL before and after chemotherapy was done. **Results** No apoptotic cell was found in any of the cases before chemotherapy. During chemotherapy, the percentage of apoptotic cells in hyperdiploid cases with DNA index (DI) 1.16~1.6 ($22.06\% \pm 8.98\%$) was higher compared with that of non-hyperdiploid cases with DI < 1.16 or DI > 1.6 ($9.38\% \pm 10.27\%$) ($P < 0.01$). **Conclusions** Hyperdiploid lymphoblasts are easier to undergo apoptosis in vivo, which is responsible for a good prognosis in childhood hyperdiploid ALL.

Key words: Acute leukemia; Apoptosis; Cell cycle; Flow cytometry; Child

DNA 倍性是儿童急性淋巴细胞性白血病(ALL)重要的预后指标之一。近年研究证明,化疗药物通过诱导细胞凋亡而致肿瘤细胞死亡,细胞凋亡程度有助于估价化疗疗效。为探讨儿童 ALL 肿瘤细胞 DNA 倍性与凋亡之间的关系,我们检测 22 例初治 ALL 患儿的 DNA 倍性及化疗前后体内肿瘤细胞的凋亡情况,报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象

1998 年 9 月至 1999 年 12 月我院初治 ALL 共 34 例,均经免疫分型。其中 22 例接受正规治疗,男 14 例,女 8 例,年龄 2~14 岁,起病时,无一例有中枢浸润。诱导采用 DVLP 方案(柔红霉素、长春新碱、左旋门冬酰胺酶、泼尼松或地塞米松)。22 例均

经2疗程诱导后完全缓解。

1.2 方法

1.2.1 单个核细胞制备 按常规方法 Ficoll 分离制备骨髓单个核细胞。

1.2.2 DNA 倍性及 DNA 周期测定 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 单个核细胞 $200 \mu\text{l}$ 中加入 RNA 酶(Sigma) $150 \mu\text{l}$, 碘化丙啶(PI) $10 \mu\text{l}$ 和 1% Triton X-100(上海试剂一厂) $10 \mu\text{l}$, 37°C 孵育 30 min, 流式细胞仪(FCM)检测。测定前以非肿瘤患儿外周血淋巴细胞定标。每份标本测定 10 000 个细胞。

DNA 指数(DI)为样本 G_0/G_1 期细胞与正常二倍体 G_0/G_1 期细胞的 DNA 荧光强度之比。我室 FCM 检测的 DI $0.9 \sim 1.10$ 为二倍体, $\text{DI} < 0.9$ 为亚二倍体, $\text{DI} > 1.10$ 为高二倍体。

1.2.3 凋亡检测 化疗前及化疗后 48~72 h 取骨髓(BM)进行凋亡小峰测定、Annexin-V-FITC/PI 双标法检测凋亡及电镜下进行凋亡形态学观察。

凋亡小峰为 G_0/G_1 期前小峰, 检测方法同 DNA 倍性检测。

Annexin-V-FITC/PI 双标记法凋亡检测: $1 \times 10^6/\text{ml}$ 单个核细胞 $20 \mu\text{l}$ 中加入 Annexin-V-FITC/PI 标记液(宝灵曼公司) $100 \mu\text{l}$, 37°C 孵育 15 min, FCM 检测。Annexin-V-FITC⁺/PI⁺ 为凋亡细胞。

电镜下凋亡形态学观察: 肝素抗凝骨髓离心后, 吸去上层血清, 分别经固定、脱水、浸透、固化、切片、染色等步骤, JEM-1200EX 电镜观察。凋亡细胞示染色质固缩, 密度增高, 凋亡小体出现。

1.2.4 FCM 应用 采用 FAScan(Becton Dickinson), 10 mV 氩离子激光光源, 激发功率 200 mW , 发射波长 488 nm 。

1.3 统计学方法

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 DNA 倍性及 DNA 周期

34 例初治 ALL, 检出 13 例异倍体。接受治疗的 22 例, 按 DI 分为两组: 高二倍体组 8 例, DI 为 $1.16 \sim 1.6$; 非高二倍体组 14 例, DI > 1.6 或 DI < 1.16 。两组相比, S 期细胞比例差异无显著性 ($P > 0.05$)。见表 1。

高二倍体组: 年龄 2~10 岁, 1 例白细胞(WBC) $> 50 \times 10^9/\text{L}$, 6 例 WBC $< 2.0 \times 10^9/\text{L}$, 肝脾肋下均 $< 5 \text{ cm}$, 免疫分型示 6 例为普通 B-ALL, 1 例为前 B-

ALL, 1 例未分型。8 例均经过诱导 14 d 骨髓完全缓解。非高二倍体组: 3 例年龄 > 10 岁, 2 例 WBC $> 50 \times 10^9/\text{L}$, 无 1 例 WBC $< 2.0 \times 10^9/\text{L}$, 2 例肝脾肋下 $> 5 \text{ cm}$, 免疫分型示 6 例为普通 B-ALL, 3 例为前 B-ALL, 2 例为成熟 B-ALL, 2 例为 T-ALL, 1 例呈淋/髓双表型 ALL。仅 5 例经诱导 14 d 骨髓完全缓解。

2.2 凋亡小峰测定

化疗前后无 1 例发现凋亡小峰。

2.3 Annexin-A-FITC/PI 双标记法凋亡检测

化疗前高二倍体组与非高二倍体组凋亡细胞比例差异无显著性 ($P > 0.05$), 化疗后高二倍体组凋亡细胞比例明显较非高二倍体组高 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 高二倍体组与非高二倍体组 S 期细胞及凋亡细胞比例

Table 1 Percentage of cells in S-phase and apoptotic cells in hyperdiploid and non-hyperdiploid groups (%)

组别	例数	S 期细胞	凋亡细胞	
			化疗前	化疗后
非高二倍体组	14	9.20 ± 4.06	2.78 ± 3.3	9.38 ± 10.27
高二倍体组	8	10.84 ± 8.05	3.53 ± 3.5	22.06 ± 8.98^a

注: a 与非高二倍体组比较 $P < 0.01$

3 讨论

DNA 倍性是判断儿童 ALL 预后的重要因素。与细胞遗传学方法相比, FCM 检测 DNA 倍性具有简便、迅速、检测细胞数量多、有群体代表性并不受肿瘤细胞增殖率、有丝分裂指数影响的优点。本组 34 例初治 ALL, 异倍体检出率为 38.2% (13/34), 与国外大组病例分析结果相似^[1-3]。

目前认为, 化疗药物消灭肿瘤细胞的主要机制是通过诱导细胞凋亡。凋亡一定程度上反映了肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。但国内外关于化疗后体内白血病细胞凋亡检测的文献很少。近年发现, 早期凋亡的特征是细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸(PS)转向膜外侧。Annexin-V 是一种特异性与 PS 结合的磷脂结合蛋白, 标记荧光后可用于 FCM 检测, 如同时结合 DNA 染料 PI, 就可检出凋亡细胞 (Annexin-V-FITC⁺/PI⁺), 并与坏死细胞相鉴别^[4]。目前国外文献将 Annexin-V-FITC/PI 双标记法作为检测凋亡最敏感的方法^[2,5-7]。

本组 22 例 ALL, 13 例化疗后可用 Annexin-V-FITC/PI 双标记法检测到凋亡 (并经电镜形态学证

实),而FCM凋亡小峰检测始终阴性,原因可能是:凋亡细胞在核物质断裂、外漏前大部分被体内吞噬细胞吞噬,而无法被检测;凋亡早期PS外翻时,尚无细胞核的改变,故无凋亡小峰出现。

80年中期国外学者已报道高二倍体儿童ALL预后优于其它DNA倍性的病人^[1]。随着FCM应用,现知高二倍体ALL的DI为1.16~1.6(相当于染色体数目51~65)^[2,8,9],用目前的标危型联合化疗方案此组患儿85%可治愈。

本组资料中,高二倍体组患儿早期缓解(指在传统评价ALL缓解时间28d以前骨髓完全缓解)率明显高于非高二倍体组患儿。已证实,早期缓解病人复发可能性小,无病生存期长^[10]。从临床特征分析:本组高二倍体患儿多为外周血低WBC性(WBC $<2.0\times 10^9/L$),与国外文献报道一致^[3];少见预后不良的免疫表型,如成熟B-ALL和T-ALL;髓外浸润不明显。但由于样本量不够大,后两点未有统计学意义。

Ito C等报道^[2],高二倍体的白血病细胞体外原代培养时,自发凋亡率最高。我们的研究结果也显示高二倍体化疗后体内肿瘤细胞的凋亡明显高于非高二倍体组,进一步支持高二倍体白血病细胞对生存环境要求极高,环境稍有改变即进入凋亡,并提示高二倍体儿童ALL预后好与此组白血病细胞易凋亡、对化疗药物敏感有关。

参考文献

[1] Look AT, Roberson PK, Williams DL, et al. Prognostic impor-

tance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood, 1985, 65(5): 1079-1086

- [2] Ito C, Kumagai M, Manabe A, et al. Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51~65 chromosomes: A distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis [J]. Blood, 1999, 93(1): 315-320.
- [3] Williams DL, Tsiaris A, Brodeur GM, et al. Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood, 1982, 60(4): 864-871.
- [4] vanEngeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, et al. Annexin-V-Affinity. A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure [J]. Cytometry, 1998, 31(1): 1-9.
- [5] Kravtsov VD, Greer JP, Whitlock JA, et al. Use of the microculture kinetic assay of apoptosis to determine chemosensitivities of leukemias [J]. Blood, 1998, 92(3): 968-980.
- [6] Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, et al. Annexin-V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis [J]. Blood, 1994, 84(5): 1415-1420.
- [7] Seiter K, Feldman EJ, Haalicka HD, et al. Phase I clinical and laboratory evaluation of Topotecan and Cytarabine in patients with acute leukemia [J]. J Clin Oncol, 1997, 15(1): 44-51.
- [8] Truworthly R, Shuster J, Look T, et al. Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: A Pediatric Oncology Group Study [J]. J Clin Oncol, 1992, 10(4): 606-613.
- [9] Pui CH, Raimonid SC, Dodge RK, et al. Prognostic importance of structural chromosomal abnormalities in children with hyperdiploid (>50 chromosomes) acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood, 1989, 73(7): 1963-1967.
- [10] Gaynon PS, Desai AA, Bostrom BC, et al. Early response to therapy and outcome in childhood lymphocytic leukemia [J]. Cancer, 1997, 80(9): 1717-1726.

(本文编辑:俞燕)