

论著·临床研究

儿童急性淋巴细胞白血病 nm23-H₁ 基因表达 及其与免疫分型的关系

宁芳,才绍江,张同娟,刘旭昕,张玉梅

(哈尔滨市儿童医院,黑龙江 哈尔滨 150010)

[摘要] **目的** 探讨儿童急性淋巴细胞白血病(ALL) nm23-H₁ 基因的表达水平及其与免疫分型的关系。**方法** 应用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)的方法检测儿童 ALL 初治、缓解、难治、复发患儿及正常对照儿童 nm23-H₁ 基因的表达水平,观察 nm23-H₁ 基因与免疫表型的关系。**结果** ①初治患儿 nm23-H₁ 表达水平明显高于正常对照组($P < 0.01$)和完全缓解组($P < 0.01$);完全缓解组 nm23-H₁ 表达水平与对照组差异无显著性($P > 0.05$),复发组 nm23-H₁ 表达水平高于正常对照组($P < 0.01$)和完全缓解组($P < 0.01$),与初治差异无显著性($P > 0.05$);难治组均为高表达。②T-ALL 的 nm23-H₁ 阳性率高于 B-ALL($P < 0.05$),且 T-ALL 的 nm23-H₁ 表达水平高于 B-ALL($P < 0.05$)。**结论** nm23-H₁ 的表达水平随儿童 ALL 的病情发展而变化,在初治、复发及难治 ALL 具有高表达,nm23-H₁ 高表达者预后差,易复发;nm23-H₁ 在 T-ALL 具有高表达,可能是 T-ALL 的缓解率低、预后差的原因之一。
[中国当代儿科杂志,2009,11(11):881-884]

[关键词] nm23-H₁; 淋巴细胞白血病; 免疫分型; 儿童
[中图分类号] R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)11-0881-04

Expression of nm23-H₁ gene in childhood acute lymphoblastic leukemia and the relationship between nm23-H₁ expression and immunophenotype

NING Fang, CAI Shao-Jiang, ZHANG Tong-Juan, LIU Xu-Xin, ZHANG Yu-Mei. Harbin Children's Hospital, Harbin 150010, China (Email: ningfang511@gmail.com)

Abstract: Objective To study the expression of nm23-H₁ gene in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and the relationship between nm23-H₁ expression and immunophenotype. **Methods** nm23-H₁ expression was measured by semiquantitative RT-PCR in children with ALL (newly diagnosed, $n = 40$; remission, $n = 32$; relapse, $n = 16$; refractory, $n = 3$). Twenty normal children served as the control group. The relationship between nm23-H₁ expression and immunophenotype was evaluated. **Results** The expression of nm23-H₁ in the newly diagnosed ALL group was significantly higher than that in the control ($P < 0.01$) and the remission groups ($P < 0.01$). There was no difference in the nm23-H₁ expression between the remission and the control groups. The expression of nm23-H₁ in the relapse group was significantly higher than that in the control ($P < 0.01$) and the remission groups ($P < 0.01$), and similar to that in the newly diagnosed ALL group. The three children with refractory ALL had higher nm23-H₁ expression. Both the positive rate and expression of nm23-H₁ in children with T-lineage ALL were higher than in children with B-lineage ALL ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression level of nm23-H₁ varies with the stages of ALL. Newly diagnosed, relapsed and refractory ALL children have higher nm23-H₁ expression. High nm23-H₁ expression may be associated with a poor prognosis and relapse. A higher expression of nm23-H₁ in children with T-ALL may be contributed to a low remission rate and a poor prognosis.
[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (11):881-884]

Key words: nm23-H₁; Lymphoblastic leukemia; Immunophenotype; Child

近年来国内外研究发现 nm23-H₁ 基因能抑制白血病细胞的分化,与白血病细胞的恶性增殖、白血病耐药及复发密切相关^[1,2]。但这些研究都是针对成人白血病进行的,目前国内外对该基因与儿童白血病的关系进行的临床研究极少。本研究采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)观察儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)初治、缓解、难治及复发患儿 nm23-H₁ 基因的表达水平及其与儿童 ALL 免疫分型的相关性,以探讨其在儿童 ALL 的发生、发展、分型、化疗方案的选择及预后等方面的价值。

[收稿日期]2009-02-19;[修回日期]2009-04-09
[基金项目]哈尔滨市科学技术局科技创新人才研究专项资金项目(2006RFQQS058)。
[作者简介]宁芳,女,硕士,副主任医师。主攻方向:小儿白血病。

1 资料与方法

1.1 实验对象

所有病例为2006年10月至2008年5月哈尔滨市儿童医院血液科、哈尔滨医科大学附属第一医院儿科住院的ALL患儿,均符合FAB标准。初治ALL 40例(初治组),男24例,女16例,年龄16个月~14岁,中位年龄6岁;经治疗完全缓解32例(完全缓解组),男19例,女13例,年龄2~12岁,中位年龄7.5岁;8例未缓解,经后续治疗难治3例(难治组),均为男孩,分别为11、13、14岁;复发16例(复发组),男10例,女6例,年龄5~15岁。正常对照组20例,为同期门诊体检健康儿童,其中男12例,女8例,年龄1~14岁,中位年龄6岁。临床治疗方案:采用VDLP(长春新碱、柔红霉素、左旋门冬酰胺酶、泼尼松)方案。临床缓解标准^[3]:依据诸福堂实用儿科学(第7版)的“ALL缓解标准”;化疗6周末达到完全缓解定为难治型。

1.2 标本的采集

(1)检测nm23-H₁基因的标本采集:初治患儿和复发患儿于化疗前采集外周血;完全缓解患儿于第1次强化治疗(即早期强化治疗)前采集外周血;正常对照组采集门诊体检健康儿童外周血,每份2~4 mL,肝素抗凝。(2)免疫分型的标本采集:初治患儿化疗前采集骨髓或外周血2~4 mL,无菌肝素抗凝,要求骨髓或外周血原始+幼稚细胞≥80%。

1.3 主要试剂与仪器

Trizol试剂为Invitrogen公司产品;RT-PCR试剂盒为Promega公司的Promega Aaccess RT-PCR System A1250;PCR仪为MJ PT-200 gradient/Thermo PX2;British UVP7500凝胶成像系统为UVP公司产品;Bio-Rad分析系统为美国Bio-Rad公司产品。

1.4 方法

1.4.1 单个核细胞(MNC)的制备及细胞总RNA的提取 取静脉血2~4 mL,肝素抗凝(100 U/mL),加等量Hank's液混匀,加于4 mL的Ficoll淋巴细胞分离液(相对密度1.007)的液面上,以2 000 r/min离心15 min,取界面层MNC,Hank's液洗涤2次,采用Trizol试剂一步法提取细胞总RNA,-80℃保存。紫外分光光度计测RNA浓度。

1.4.2 逆转录及PCR扩增 反应体系50 μL,内含AMV/Tfi 5×反应缓冲液10 μL,dNTP混合物1 μL,25 mmol/L MgSO₄ 4 μL,AMV反转录酶1 μL,Tfi DNA聚合酶1 μL,RNA样品5 μL,上游引物及

下游引物(浓度10 pmol/μL)各5 μL,无核酸水加至50 μL。在内对照反应体系中加入GAPDH上、下游引物(浓度10 pmol/μL)各5 μL,其他组份和反应条件同nm23-H₁体系。反应条件:将装有反应体系的PCR管加入PCR仪。48℃ 45 min 1个循环;94℃ 2 min 1个循环;95℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 30 s 50个循环,72℃ 2 min 1个循环;4℃储存。

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。nm23-H₁基因上游引物为5'-ATGGCCAACTGTGAGCGTACC-3',下游引物为5'-CATGTATTTTCAC-CAGGCCGGC-3',扩增产物长度为204 bp^[4,5],GAPDH上游引物为5'-ACATCGCTCAGACACCATGG-3',下游引物为5'-GTAGTTGAGGTCAATGAAGGG-3',扩增产物长度为150 bp。

PCR产物分析:取10 μL扩增产物在15 g/L琼脂糖凝胶上进行电泳(70 V,40 min),UVP7500凝胶成像系统进行扫描照像,以Bio-Rad分析系统计算nm23-H₁和GAPDH扩增产物的灰度相对比值来表示nm23-H₁的表达水平。

1.4.3 免疫分型 所有初治ALL患儿均进行了免疫分型。治疗前取肝素抗凝骨髓5 mL,常规分离单个核细胞,采用活细胞间接荧光标记,Epics XL型流式细胞仪检测。所用单抗包括B系:CD10、CD19、CD22;T系:CD2、CD5、CD7;髓系:CD11、CD13、CD33、CD64;干/祖系:CD34、CD38、CD117、HLA-DR。阳性标准:荧光细胞≥20%,CD34>10%。

1.4.4 统计学分析方法 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,其数值为正态分布,多个样本均数多重比较采用LSD-*t*检验及Dunnett-*t*检验;两样本均数比较采用*t*检验;计数资料的比较采用 χ^2 检验及精确概率法。数据处理采用SPSS 14.0统计软件。

2 结果

2.1 nm23-H₁在不同病期儿童ALL中的表达

各组儿童nm23-H₁阳性表达例数及表达水平见表1。初治组nm23-H₁表达水平明显高于正常对照组($t=5.47, P<0.01$)和完全缓解组($t=6.33, P<0.01$)。完全缓解组nm23-H₁表达水平与正常对照组相比,差异无显著性($t=0.33, P>0.05$)。复发组nm23-H₁表达水平明显高于正常对照组($t=6.35, P<0.01$)和完全缓解组($t=7.04, P<0.01$);但与初治组相比差异无显著性($t=1.64, P>0.05$)。难治组3例,nm23-H₁表达水平分别为1.27、1.06、0.98,均为高表达。

表 1 各组儿童 nm23-H₁ 的表达 (x±s)

组别	例数	nm23-H ₁ 阳性例数	nm23-H ₁ 表达
正常对照组	20	3	0.10±0.06
初治组	40	26	0.92±0.23 ^{a,b}
完全缓解组	32	5	0.16±0.11
复发组	16	15	1.05±0.32 ^{a,b}

a:与正常对照组比较,P<0.01; b:与完全缓解组比较,P<0.01

2.1.2 nm23-H₁ 表达水平与免疫分型的关系

对 40 例初治 ALL 进行了免疫分型,其中 B 系 23 例,nm23-H₁ 阳性 11 例;T 系 15 例,nm23-H₁ 阳性 13 例;B 系加 T 系 1 例,B 系加髓系 1 例,nm23-H₁ 均阳性,表达水平分别为 1.15、1.07。

T-ALL 组 nm23-H₁ 阳性率显著高于 B-ALL 组 (P<0.05)。T-ALL 组 nm23-H₁ 表达水平也高于 B-ALL 组 (t=2.67,P<0.05)。见表 2。

表 2 nm23-H₁ 在不同类型 ALL 中的表达

[例(%);x±s]			
组别	例数	nm23-H ₁ 阳性	nm23-H ₁ 表达
B-ALL	23	11(48)	0.76±0.14
T-ALL	15	13(87) ^a	1.04±0.21 ^a

a:与 B-ALL 组比较,P<0.05

3 讨论

nm23 基因是 1988 年由美国国立癌症研究所 Steeg 等^[6]采用消减杂交技术从 7 株具有不同转移潜力的鼠 K-1735 黑色素瘤细胞系 cDNA 文库中分离出来,定位于 17 号染色体长臂(17q21)。人类 nm23 基因家族主要由 3 个基因即 nm23-H₁,nm23-H₂ 和 nm23-H₃ 组成。其中 nm23-H₁ 与肿瘤转移关系更为密切。研究表明 nm23-H₁ 表达与某些肿瘤的转移潜力成反比,被称为转移抑制基因,它的表达减低与乳腺癌、肝癌、卵巢癌、胃癌和黑色素瘤的高转移性和癌性恶化有关^[7]。nm23-H₁ 抑制肿瘤转移的机制有以下几方面:①nm23-H₁ 基因编码产生的蛋白质与二磷酸核苷激酶(NDPK)氨基酸顺序具有高度同源性,能把结合于蛋白质上的二磷酸核苷(NDP)磷酸化成三磷酸核苷(NTP),调节着细胞内 NTP 池的大小和细胞分裂。nm23-H₁ 的一个等位基因失活可能导致 NDPK 的 A、B 两亚单位比例失衡,使 NDPK 发生改变,一方面可引起 NTP 产生不足,影响微管聚合,导致染色体畸变和非整倍体形成,从而驱动肿瘤转移。另一方面可以驱动细胞骨架和微管聚合或 G 蛋白介导的对细胞素信号反应的变化,引起细胞运动的改变,促进浸润过程^[8]。

②nm23-H₁ 蛋白的氨基酸序列中存在 2~3 个亮氨酸拉链结构,可促进蛋白:蛋白二聚体形成,这种二聚体通过碱性氨基酸的延伸与 DNA 结合,因而 nm23-H₁ 蛋白也可能以转录激活因子起作用发挥调节功能^[9]。③nm23-H₁ 蛋白丝氨酸磷酸化可能直接或间接抑制细胞信号传递而抑制转移。近年来研究发现,nm23-H₁ 蛋白又是多种血液肿瘤的分化抑制因子,nm23-H₁ 基因能抑制白血病细胞的分化,与白血病细胞的恶性增殖相关,故与白血病耐药、复发及预后密切相关^[1,2]。nm23-H₁ 基因的低表达伴随着细胞分化及成熟,而高表达则抑制了白血病细胞的分化^[4]。关于 nm23 基因在造血恶性肿瘤方面的研究,国内外开展不多,nm23-H₁ 基因对白血病细胞分化抑制的具体机制目前还不清楚。

本研究发现,初治患儿 nm23-H₁ 表达水平明显高于正常对照组和完全缓解患儿;完全缓解患儿 nm23-H₁ 表达水平与对照组差异无显著性。复发及难治患儿 nm23-H₁ 表达水平高于正常对照组和完全缓解患儿,与初治患儿差异无显著性。这说明在 ALL 的病程中,初次治疗时 nm23-H₁ 的表达水平较高,完全缓解后其表达水平下降或不表达。复发时 nm23-H₁ 表达水平又上升,而难治患者 nm23-H₁ 持续高表达,所以监测 nm23-H₁ 表达水平的变化可以反映儿童 ALL 的病情变化,高表达者预后差、易复发。本研究进一步探讨了 nm23-H₁ 表达水平与免疫分型的关系,发现 T-ALL 组 nm23-H₁ 阳性表达率及表达水平均高于 B-ALL 组,这和临床上 T-ALL 比 B-ALL 疗效差、缓解率低、易复发相一致。总之,nm23-H₁ 高表达可能是儿童 ALL 的一个不利因素,可以作为监测病情、判定疗效、预测复发、评估预后的一个临床指标。

[参 考 文 献]

[1] 李海燕,刘洁生,王一飞. nm23H₁ 与白血病和淋巴瘤的预后关系[J]. 生理学进展,2003,1(34):74-77.
[2] 孟庆祥,姜容,杨保青,张红宇,柳金,庞丽萍. 分化抑制因子 nm23 基因在急性白血病细胞中的表达及临床意义[J]. 中华血液杂志,2003,7(24):369-371.
[3] 吴敏媛,胡亚美. 急性淋巴细胞性白血病[M]. //胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学(下册). 第 7 版. 北京:人民卫生出版社,2002,2204.
[4] Yokoyama A, Okabe-Kado J, Wakimoto N, kobayashi H, Sakashita A, Maseki N, et al. Evaluation by multivariate analysis of the differentiation inhibitory factor nm23 as a prognostic factor in acute myelogenous leukemia and application to other hematologic malignancies[J]. Blood, 1998, 91(6):1845-1851.
[5] 吴少玲,赵新东,赵洪国,刘金兰. 急性淋巴细胞白血病患者 nm23-H₁ mRNA 表达及临床意义[J]. 白血病淋巴瘤,2002,2

(11):102-103.

[6] Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, et al. Evidence of a novel gene associated with low tumor metastatic potential [J]. J Natl Cancer Inst, 1988, 80(3): 200-204.

[7] Kapoor S. nm23-H₁ expression and its role in the evolution of non-gastrointestinal malignancies [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(4):506-507.

[8] Korabiowska M, Hönig JF, Jawien J, Knapik J, Stachura J, Cor-

don-Cardo C, et al. Relationship of nm23 expression to proliferation and prognosis in malignant melanomas of the oral cavity [J]. In Vivo, 2005, 19(6):1093-1096.

[9] Yaguchi H, Ohkura N, Tsukada T, Yamaguchi K. Menin, the multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, exhibits GTP-hydrolyzing activity in the presence of the tumor metastasis suppressor nm23 [J]. J Biol Chem, 2002, 277(41):38197-38204.

(本文编辑:徐福兰)

· 病例报告 ·

床边碘水灌肠 X 线照片诊断先天性肠旋转不良 1 例

郑丽玲, 黄仲玲, 杨鸿, 许丽萍

(福建医科大学附属漳州市医院儿科, 福建 漳州 363000)

[中图分类号] R726.2 [文献标识码] E [文章编号] 1008-8830(2009)11-0884-01

患儿,男,2 h,因生后呻吟、发绀 2 h 入院。患儿系第 2 胎第 1 产,足月,因“宫内窘迫”行剖宫产出生。出生时羊水清,出生体重 3 400 g, Apgar 评分 1、5、10 min 分别为 9 分、10 分、10 分,生后无痰鸣、气促,反应差,哭声稍弱。生后半小时内出现面色苍白,呻吟、口周发绀。入院查体:体重 3 400 g,心率 165 次/min,呼吸 78 次/min, SaO₂ 50%,反应差,呻吟,口周及四肢发绀,呼吸急促,三凹征阳性,双肺呼吸音粗,可闻及较多水泡音,右下腹可触及一 5 cm×6 cm 大小肿物,质地稍硬,可活动,表面光滑,肝脾肋下未触及。入院诊断为“急性呼吸窘迫综合征、新生儿肺炎、腹部肿物待查”,予气管插管、呼吸机辅助呼吸及抗感染等治疗。患儿于生后第 2 天排胎粪 3 次后未再出现排大便,且逐渐出现腹胀、胃管内引流出草绿色胃内容物,量约 20 mL/日,腹胀逐步加剧,肠鸣音明显减弱,腹肌稍紧张,肿物未见改变,考虑可能合并外科疾患,于生后第 4 天行床边腹部立位平片,未见典型的双泡征及肠梗阻的表现。由于患儿呼吸情况不稳定,不宜外出检查,故选择床边碘水灌肠 X 线检查。摄片前于肛门口注入 76% 泛影葡胺 20 mL,加注射用水稀释成 40 mL,缓慢注入 5 min 后,置患儿于抢救台上 30 度倾斜位,行 X 线检查,显示回盲部位于右上腹。请外科会诊,考虑先天性肠旋转不良,即行剖腹探查术,术中见腹腔黄褐色腹水约 100 mL,回盲部位于右上腹, Ladd 带压迫十二指肠降段致十二指肠肠腔狭窄,距离回盲瓣 5 cm 处回肠末段系膜上见一 4 cm×4 cm 大小囊性肿物,包膜完整,末段回肠与回盲部顺时针 360°扭转,末段回肠坏死,长约 10 cm,无穿孔。术后诊断:1、肠旋转不良并十二指肠降段梗阻;2、回肠末段扭转坏死;3、腹腔囊性肿物:肠重复畸形。经治疗后痊愈出院。

讨论:先天性肠旋转不良是胚胎时期肠发育异常,肠管以肠系膜为轴的正常回转运动障碍,使肠管位置变异;肠系膜附着不全和异常腹膜系带导致十二指肠、空肠受压和肠扭转等的病变,是小儿尤其是新生儿急性肠梗阻的主要原因之一^[1]。多数在新生儿期即出现症状,表现为呕吐,吐出物内都含有胆汁。若十二指肠梗阻较轻,则立位腹部平片很少出现典型的双泡征,腹部平片缺乏本病的定性诊断依据,价值有限。大多数文献报告胃肠钡餐造影检查是确诊先天性肠旋转不良的首选方法^[2]。但因小儿结肠冗长,走行弯曲,检查时应透视观察钡剂头部走向,增加放射线对患儿的损伤^[3]。同时对于危重的患儿,造影剂检查容易出现吸入性肺炎,有窒息死亡的可能。对于病情危重的患儿不宜到放射科检查,较难早期获得诊断。通过此例的诊断,对于基层医院无胃肠造影机、CT、MRI 等检查措施,同时病情较危重的患儿,选择用 76% 泛影葡胺床边 X 线片检查既经济、方便、简单、快速,又减少患儿放射线的吸入,无疑是一种较好较简单的检查方法。但对于回盲部位置正常的患儿,通过此检查有一定缺陷,这时需要注意观察临床表现及体征及是否有外科手术指征等进一步明确诊断。

[参 考 文 献]

[1] 齐新. 肠旋转不良术后并坏死性小肠结肠炎致肠狭窄 1 例 [J]. 实用儿科临床杂志, 2002, 17(3):205.

[2] 刘林祥, 赵己未. 先天性肠旋转不良 1 例 [J]. 医学影像杂志, 2008, 18(2):150-154.

[3] 李洪火. 先天性肠旋转不良 X 线诊断探讨 [J]. 现代实用医学, 2002, 14(1):33-34.

(本文编辑:王庆红)

[收稿日期] 2009-03-23; [修回日期] 2009-05-19
[作者简介] 郑丽玲, 女, 大学, 医师。主攻方向: 新生儿疾病。