

论著·临床研究

## cAMP 反应元件结合蛋白/Bcl-2 在小儿急性白血病骨髓细胞中的表达及意义

文川<sup>1</sup> 马夫天<sup>2</sup> 万伍卿<sup>1</sup>

(1. 中南大学湘雅二医院儿科, 湖南 长沙 410011; 2. 河北医科大学附属第二医院儿科, 河北 石家庄 050000)

**[摘要]** 目的 探讨 cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)和 Bcl-2 在小儿急性白血病骨髓细胞中的表达及临床意义。方法 92 例急性白血病患者和 30 例非恶性血液病患者(对照组)纳入研究。采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 CREB 和 Bcl-2 在骨髓单个核细胞内的表达。结果 CREB 和 Bcl-2 在急性白血病患者骨髓中的表达明显高于对照组( $P < 0.01$ ); CREB 和 Bcl-2 在急性淋巴细胞白血病(ALL)和急性髓细胞白血病(AML)患儿骨髓中表达差异无统计学意义;髓外浸润组患儿骨髓 CREB 和 Bcl-2 的表达明显高于非髓外浸润组患儿( $P < 0.05$ );完全缓解组 CREB 和 Bcl-2 的表达显著低于非完全缓解组( $P < 0.01$ );急性白血病患者骨髓 CREB 和 Bcl-2 mRNA 的表达与外周血白细胞计数呈正相关,相关系数分别为 0.62 和 0.71 ( $P < 0.05$ ); CREB 和 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达分别呈正相关,相关系数分别为 0.75 和 0.68 ( $P < 0.05$ )。结论 CREB 和 Bcl-2 表达可能与小儿白血病发病机制和临床预后存在相关性,但可能与小儿急性白血病类型无相关性。 [中国当代儿科杂志, 2010, 12(3):177-180]

**[关键词]** cAMP 反应元件结合蛋白; Bcl-2; 急性白血病; 儿童

**[中图分类号]** R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)03-0177-04

### Expression of CREB/Bcl-2 in bone marrow mononuclear cells of children with acute leukemia

WEN Chuan, MA Fu-Tian, WAN Wu-Qing. Department of Pediatrics, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China (Email: wc740317@tom.com)

**Abstract: Objective** To study the expression and role of cyclic-AMP response binding protein (CREB) and Bcl-2 in children with acute leukemia. **Methods** Ninety-two children with acute leukemia (leukemia group) and 30 children with non-hematologic malignancies (control group) were enrolled. The mRNA and protein expression of CREB and Bcl-2 in bone marrow mononuclear cells were measured by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. **Results** The mRNA and protein expression of CREB and Bcl-2 in the leukemia group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.01$ ). There were no significant differences in the expression of CREB and Bcl-2 between acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia subgroups. At the initial diagnosis, the mRNA and protein expression of CREB and Bcl-2 in children with extramedullary infiltration was higher than that in children without ( $P < 0.05$ ). In the leukemia group, the mRNA and protein expression of CREB and Bcl-2 in the complete remission subgroup was significantly lower than that in the non-complete remission subgroup ( $P < 0.01$ ). High mRNA expression of CREB and Bcl-2 in the leukemia group was positively correlated with peripheral blood leucocyte counts ( $r = 0.62, 0.71$  respectively,  $P < 0.05$ ). There was a positive correlation between mRNA and protein expression of CREB and Bcl-2 ( $r = 0.75, 0.68$  respectively;  $P < 0.05$ ). **Conclusions** The expression of CREB and Bcl-2 may be correlated with the pathogenesis and clinical prognosis of childhood leukemia, however, their expression may not be associated with the classification of acute leukemia. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(3):177-180]

**Key words:** Cyclic-AMP response binding protein; Bcl-2; Acute leukemia; Child

急性白血病(acute leukemia, AL)是儿童最常见恶性肿瘤之一,严重威胁儿童的生命,到目前为止,其发病机制仍不明确。有研究表明,cAMP 反应元件结合蛋白(cyclic-AMP response binding protein,

CREB)是一种促进细胞存活和增殖,抑制细胞凋亡的核转录调节因子,在正常造血的维持和白血病发生中有重要作用;Bcl-2 是一种凋亡抑制基因,与恶性肿瘤的发生密切相关。关于 CREB 和 Bcl-2 在儿

童 AL 发病机制及临床预后中的作用及二者的相关性研究甚少,本研究以 AL 患儿为对象,探讨 CREB 和 Bcl-2 在小儿 AL 发病机制及临床预后中的作用,为儿童 AL 治疗提供分子生物学证据。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象及分组

随机选择 2006 年 1 月至 2008 年 6 月住院的 AL 患儿 92 例,男性 50 例,女性 42 例,年龄 1.2 ~ 14 岁,中位年龄 6.5 岁,所有患儿经骨髓细胞形态学、免疫组化确诊。根据急性白血病分型标准,急性淋巴细胞白血病(ALL)59 例(B 细胞性 ALL 19 例,T 细胞性 ALL 40 例);急性髓细胞白血病(AML)33 例(M1 6 例,M2 18 例,M4 5 例,M5 3 例,M7 1 例)。对照组患儿 30 例为非恶性血液病者,年龄 1.5 ~ 12 岁,男性 19 例,女性 11 例,其中感染性疾病 12 例(败血症 8 例,传染性单核细胞增多症 4 例),缺铁性贫血 11 例和血小板减少性紫癜 7 例,30 例患儿均有骨髓穿刺的指征。

将初诊的 92 例 AL 患儿分为 ALL 组和 AML 组,并进一步分为髓外浸润(ALL 45 例,AML 26 例)和非髓外浸润(ALL 14 例,AML 7 例)两亚组。出现下列体征之一即为髓外浸润:除外肝病及髓外造血后,肝或脾明显肿大,化疗后缩小或正常;一组多个淋巴结或两组以上淋巴结明显肿大,化疗后缩小或正常;脑脊液发现白血病细胞或双侧睾丸无痛性肿大,睾丸活组织检查白血病细胞浸润;牙龈明显增生肿胀,化疗后消失;皮肤浸润斑块或结节,化疗后消失<sup>[1]</sup>。

### 1.2 治疗方案

ALL 采用 VDLP(长春新碱 + 柔红霉素 + 泼尼松 + 左旋门冬酰胺酶)诱导缓解方案;AML 采用 DAE(柔红霉素 + 阿糖胞苷 + VP16)诱导缓解方案。化疗后复查骨髓缓解情况,按国内现行标准<sup>[2]</sup>,完全缓解 52 例(其中 ALL 组 36 例,AML 组 16 例),未缓解 35 例(其中 ALL 组 20 例,AML 组 15 例),失访 5 例。

### 1.3 RT-PCR

所有 AL 患儿在初诊时采外周血进行白细胞计数、血红蛋白定量及血小板计数。患儿初诊未治疗时抽取骨髓 3 mL,肝素抗凝,Ficoll 液(天津浩阳生物制品有限公司)分离单个核细胞,用 RAN 提取试剂盒(美国 MBI 公司)提取 RNA,操作按说明书进行;RT-PCR 试剂盒购自美国 MBI 公司;引物序列

(上海生物工程技术有限公司):CREB:正向引物 5'-GACTTTCTCCGGAAGTCA-3',反向引物 5'-CGGTACCATTGCTAGCCAG-3',扩增片段 312 bp;Bcl-2:正向引物 5'-CGCTTTGCCACGGTGGTGGAG-3',反向引物 5'-GTACATCACTGACAATGC-3',扩增片段 415 bp; $\beta$ -actin,正向引物 5'-TTADCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTC-3',反向引物 5'-GTCCGATTGATGAAACCCAGACACA-3',扩增片段 168 bp。PCR 反应条件:94℃ 5 min,94℃ 1 min,退火(CREB 55℃、Bcl-2 60℃、 $\beta$ -actin 50℃)1 min,72℃ 2 min,72℃ 5 min,40 个循环。扩增产物各 10  $\mu$ L,在 20 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳,UVP 紫外凝胶分析系统摄像,凝胶成像分析系统(Bio-RAD 公司)测定对应的目的基因和内参  $\beta$ -actin PCR 产物条带的吸光度和面积之积,并分别计算 CREB 和 Bcl-2 与  $\beta$ -actin 的比值,反映相应目的基因 mRNA 的含量。

### 1.4 Western blot

骨髓标本中分离出单个核细胞,细胞裂解液提取蛋白,离心收集上清蛋白样本,考马斯亮蓝法测定蛋白质含量,取等量蛋白行 10% 的 SDS-PAGE,电泳后转移至硝酸纤维素膜,0.1% 丽春红染液染色,TBST 洗涤 3 次,5% 脱脂奶粉封闭过夜,分别加入兔抗人 CREB 和 Bcl-2 抗体(美国 Santa-Cruze 公司),37℃ 3 h,辣根酶标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物制品有限公司)室温 2 h,洗膜,DAB(北京中杉金桥生物制品有限公司)显色,图像分析软件(Bio-RAD 公司)处理。

### 1.5 统计学处理

数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 11.0 统计软件处理,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组骨髓单个核细胞 CREB 和 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达比较

ALL 组及 AML 组 CREB 和 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平均高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );但 ALL 组及 AML 组之间 CREB mRNA 和 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图 1)。

### 2.2 细胞浸润对骨髓单个核细胞 CREB 和 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达的影响

无论是在 ALL 或 AML 患儿中,CREB 和 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平在髓外浸润亚组均显著

高于非髓外浸润亚组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图2)。

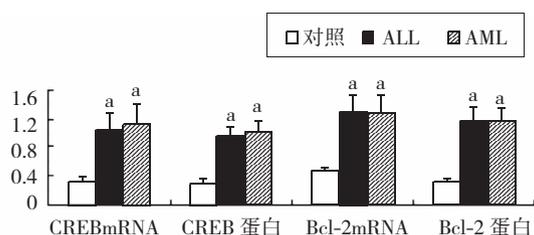


图1 各组 CREB 和 Bcl-2 表达比较 a: 与对照组比较,  $P < 0.01$ 。

## 2.4 相关分析 Spearman 秩相关分析

CREB 和 Bcl-2 mRNA 与外周血白细胞计数呈正相关, 相关系数分别为 0.62 和 0.71 ( $P < 0.05$ ); 而与血红蛋白含量和血小板计数无相关性; CREB 和 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达均呈正相关关系, 相关系数分别为 0.75 和 0.68 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

CREB 是 cAMP 应答元件结合蛋白的简称, 是一种重要的核转录调节因子, 对细胞存活、分化、再生起重要作用。许多研究发现, CREB 可通过调节相关基因表达, 抑制细胞凋亡, 与白血病发病机制密切相关, 其高表达对白血病临床预后有着重要影响<sup>[3-5]</sup>。Bcl-2 蛋白是 Bcl-2 原癌基因的编码产物, 是细胞存活促进因子, 通过调节线粒体中的蛋白质尤其是细胞色素 C 的释放抑制细胞凋亡, 与肿瘤发生关系密切<sup>[6-7]</sup>。现代医学认为, 白血病发病机制存在增殖失控、分化障碍及凋亡抑制等生物学特点, 造血细胞恶性增殖, 凋亡受抑是白血病发病的主要病理学机制, 并决定着白血病患者的临床预后<sup>[8-10]</sup>, 凋亡相关基因的表达与白血病基础及临床的研究一直是临床的研究热点。本研究发现急性白血病患者无论 ALL 还是 AML, 骨髓单个核细胞 CREB 和 Bcl-2 在基因转录和翻译水平的表达均明显高于非恶性血液系统疾病患者, 且二者在 ALL 和 AML 中差异无统计学意义。Crans-Vargas 等<sup>[11]</sup> 采用 Western blot 和免疫组化研究发现, CREB 在 ALL 和 AML 表达显著高于 AL 缓解期患者或非白血病患者, 但未见 CREB 表达在白血病类型中的差异性, 也许与样本量少有关; Pigazzi 等<sup>[12]</sup> 研究发现儿童白血病无论 ALL 或 AML, 与对照组相比均有 CREB 过度表达, 并认为 cAMP/CREB/ICER 信号通路在白血病基因表达和儿童 AL 发病学中起重要作用。Moon 等<sup>[13]</sup> 最近的研究发现, 白血病患者 Bcl-2 表达显著增加, 且与不良临床预后呈相关性。一些研究表明, 在促进细胞增殖与存活, 抑制凋亡机制中, Bcl-2 可能是 CREB 的下游信号。Zhang 等<sup>[14]</sup> 研究发现, B 细胞内 CREB 的 Ser133 磷酸化激活, 可使 Bcl-2 表达量显著增加; 由丙氨酸取代 CREB 的 Ser133, 则 B 细胞表达 Bcl-2 显著降低, 增殖障碍, 容易凋亡。本研究也发现, CREB 和 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达均呈正相关。Joo 等<sup>[15]</sup> 也发现, 磷酸化激活的 CREB 能诱导 Bcl-2 家族成员 Mcl-1 和 c-fos 基因表达, 从而促进增殖抑制凋亡。体外实验发现, IgH 增强子作用

图2 髓外浸润与非浸润组 CREB 和 Bcl-2 表达比较

$P < 0.05$ 。

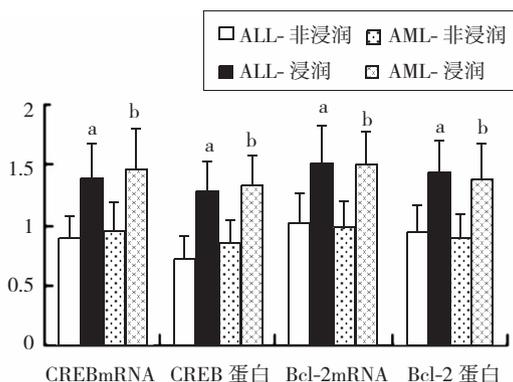


图2 髓外浸润与非浸润组 CREB 和 Bcl-2 表达比较 a: 与 ALL-非浸润组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与 AML-非浸润组比较,  $P < 0.05$ 。

## 2.3 完全缓解组和未缓解组骨髓单个核细胞 CREB 和 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达比较

AL 患儿中完全缓解组 CREB 和 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白质表达均显著低于未缓解组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图3)。

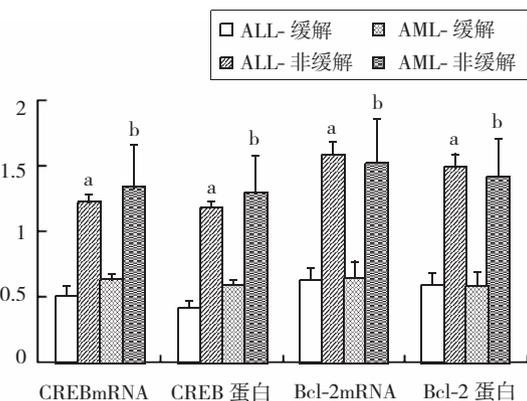


图3 完全缓解和未缓解组 CREB 和 Bcl-2 表达比较 a: 与 ALL-完全缓解组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与 AML-完全缓解组比较,  $P < 0.01$ 。

下, CREB 能识别 Bcl-2 基因启动子上的 CRE 位点, 增强该启动子的活性, 上调 Bcl-2 表达<sup>[16]</sup>。本研究结合既往的相关研究提示, 造血系统 CREB 和 Bcl-2 高表达, 可能与造血细胞恶性增殖, 凋亡受抑, 白血病的发病机制有关, CREB 高表达可能通过上调 Bcl-2 在白血病发病中发挥重要作用; CREB 和 Bcl-2 过度表达可能是 ALL 和 AML 的共同机制, 但与 AL 类型特异性无关, 其具体原因有待进一步扩充样本量进行研究。

本研究进一步发现, CREB 和 Bcl-2 表达与外周血白细胞计数呈正相关, 并且在髓外浸润中表达明显高于非髓外浸润, 提示 CREB 和 Bcl-2 高表达可能与白血病细胞浸润有关。有研究发现, CREB 能促进多种肿瘤细胞(包括白血病细胞)成活、生长和转移, 减少 CREB 表达量可抑制白血病细胞生长, 延缓病程, 改善预后<sup>[17]</sup>。Bcl-2 高表达与白血病患者骨髓中幼稚细胞比例及 FAB 分型无关, 而与初诊时外周血 WBC 计数, 髓外浸润密切相关, 并直接影响对化疗的反应<sup>[18]</sup>。CREB 和 Bcl-2 过度表达与白血病细胞浸润的相关机制, 国内外研究甚少, 需进一步基础及临床研究予以探索。

在本研究中, AL (ALL 或 AML) 治疗后未缓解组骨髓单个核细胞 CREB 和 Bcl-2 表达比完全缓解组显著增加, 使 AL 细胞有可能长期存活并蓄积增加, 影响临床疗效。Pino 等<sup>[19]</sup> 研究发现, CREB 高表达与细胞增殖和存活正相关, 抑制 CREB 表达, 可阻遏肿瘤细胞恶性增殖, 增强化疗药物敏感性。有研究发现, Bcl-2 高表达能阻遏化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡, 与化疗药物疗效存在相关性<sup>[20]</sup>。根据研究结果, 检测初诊 AL 患儿骨髓细胞 CREB 和 Bcl-2 的表达水平对临床预后的判断可能有一定参考价值。

### [参 考 文 献]

[1] 李晟, 陈子兴, 王玮, 岑建农, 傅建新, 姚利. CXCR4 在急性白血病细胞中的表达及其对髓外浸润的意义[J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(7):405-408.

[2] 顾龙君. 中华医学会儿科学分会血液学组. 儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议:第三次修订草案[J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(5):392-395.

[3] Shankar DB, Cheng JC, Sakamoto KM. Role of cyclic AMP response element binding protein in human leukemias[J]. Cancer, 2005, 104(9):1819-1824.

[4] Siu YT, Jin DY. CREB—a real culprit in oncogenesis[J]. FEBS J, 2007, 274(13):3224-3232.

[5] Cheng JC, Esparza S, Sandoval S, Shankar D, Fu C, Sakamoto

KM. Potential role of CREB as a prognostic marker in acute myeloid leukemia[J]. Future Oncol, 2007, 3(4):475-480.

[6] Orelio C, Dzierzak E. Bcl-2 expression and apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells[J]. Leuk Lymphoma, 2007, 48(1):16-24.

[7] Vogler M, Dinsdale D, Dyer MJ, Cohen GM. Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on cancer therapy[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(3):360-367.

[8] Tabe Y. Molecular diagnosis of and molecular targeting therapy for leukemia[J]. Rinsho Byori, 2009, 57(2):137-145.

[9] Fulda S. Therapeutic opportunities for counteracting apoptosis resistance in childhood leukaemia[J]. Br J Haematol, 2009, 145(4):441-454.

[10] Schuler D, Szende B. Apoptosis in acute leukemia[J]. Leuk Res, 2004, 28(7):661-666.

[11] Crans-Vargas HN, Landaw EM, Bhatia S, Sandusky G, Moore TB, Sakamoto KM. Expression of cyclic adenosine monophosphate response-element binding protein in acute leukemia[J]. Blood, 2002, 99(7):2617-2619.

[12] Pigazzi M, Ricotti E, Germano G, Faggian D, Aricò M, Basso G. cAMP response element binding protein (CREB) overexpression CREB has been described as critical for leukemia progression[J]. Haematologica, 2007, 92(10):1435-1437.

[13] Moon JH, Sohn SK, Lee MH, Jang JH, Kim K, Jung CW, et al. BCL2 gene polymorphism could predict the treatment outcomes in acute myeloid leukemia patients[J]. Leuk Res, 2010, 34(2):166-172.

[14] Zhang CY, Wu YL, Boxer LM. Impaired proliferation and survival of activated B cells in transgenic mice that express a dominant-negative cAMP-response element-binding protein transcription factor in B cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(50):48359-48365.

[15] Joo EK, Broxmeyer HE, Kwon HJ, Kang HB, Kim JS, Lim JS, et al. Enhancement of cell survival by stromal cell-derived factor-1/CXCL12 involves activation of CREB and induction of Mcl-1 and c-Fos in factor-dependent human cell line MO7e[J]. Stem Cells Dev, 2004, 13(5):563-570.

[16] Swart JM, Bergeron DM, Chiles TC. Identification of a membrane Ig-induced p38 mitogen-activated protein kinase module that regulate cAMP response element binding protein phosphorylation and transcriptional activation in CH31 B cell lymphomas[J]. J Immunol, 2000, 164(5):2311-2319.

[17] Aucoin R, Reiland J, Roy M, Marchetti D. Dominant-negative CREB inhibits heparanase functionality and melanoma cell invasion[J]. J Cell Biochem, 2004, 93(2):215-223.

[18] 赵晓庆, 李根山, 郭稳捷, 李艳芝. bcl-2 和 bax 蛋白在儿童急性白血病表达及临床意义[J]. 中国当代儿科杂志, 1999, 1(4):193-195.

[19] Pino MS, Nawrocki ST, Cognett F, Abruzzese JL, Xiong HQ, McConkey DJ. Prostaglandin E2 drives cyclooxygenase-2 expression via cyclic AMP response element activation in human pancreatic cancer cells[J]. Cancer Biol Ther, 2005, 4(11):1263-1269.

[20] Sachs L, Lotem J. Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy[J]. Blood, 1993, 82(1):15-21.

(本文编辑:黄 榕)