

· 临床研究 ·

GYPC 和 TRIP3 基因表达水平与 儿童急性淋巴细胞白血病预后的关系

张剑白¹, 李晓辉¹, 宁芳², 郭雪松²

(1. 哈尔滨医科大学第一临床医院儿内科, 黑龙江 哈尔滨 150001; 2. 哈尔滨市儿童医院儿内科 黑龙江 哈尔滨 150001)

[摘要] **目的** 研究儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)复发及缓解的分子生物学机制,探讨 *GYPC*、*TRIP3* 基因的表达水平与儿童 ALL 预后的关系。**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 初治患者、缓解患者、复发患者及正常对照儿童 *GYPC* 基因、*TRIP3* 基因的表达。**结果** 儿童 ALL *GYPC* 基因表达:①*GYPC* 基因表达水平在复发患者中最高,不仅高于正常对照组($P<0.01$)和完全缓解组($P<0.01$),也高于初治组($P<0.01$)。②初治患者中,*GYPC* 基因阳性表达者的完全缓解(CR)率与阴性表达者差异无显著性,但未缓解患者治疗前 *GYPC* 基因表达水平高于完全缓解患者($P<0.05$)。儿童 ALL *TRIP3* 基因表达:①*TRIP3* 基因在初治组 ALL 中的表达水平与复发组 ALL 中的表达水平相比差异无显著性,在缓解组 ALL 中表达水平明显高于复发组及初治组($P<0.01$)及正常对照组;②在初治的 ALL 患儿中,*TRIP3* 基因表达阳性者其治疗后的完全缓解率高于表达阴性者($P<0.05$)。完全缓解患者治疗前 *TRIP3* 基因表达水平高于未缓解患者($P<0.05$)。**结论** *GYPC* 可能是儿童 ALL 的不利因素,*GYPC* 高表达者疗效差,易复发。*TRIP3* 基因高表达者对化疗药物反应敏感,易于缓解。

[中国当代儿科杂志,2009,11(1):29-32]

[关键词] 急性淋巴细胞白血病;复发;缓解;儿童

[中图分类号] R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)01-0029-04

Relationship between expression of *GYPC* and *TRIP3* genes and prognosis of acute lymphoblastic leukemia in children

ZHANG Jian-Bai, LI Xiao-Hui, NING Fang, GUO Xue-Song. Department of Pediatrics, First Clinical Hospital Affiliated to Harbin Medical University, Harbin 150001, China (Email: hydlxh@163.com)

Abstract: Objective To study the relationship of *GYPC* and *TRIP3* gene expression and the prognosis of acute lymphoblastic leukemia (ALL) in children in order to explore the molecular biological mechanisms of recurrence and remission of ALL. **Methods** Thirty-eight newly diagnosed ALL children were enrolled. Of the 38 patients, 31 achieved complete remission (CR) and 12 relapsed. Semi-quantitative RT-PCR was employed to measure blood *GYPC* and *TRIP3* gene expression. Twenty blood samples from normal children were used as controls. **Results** Blood *GYPC* expression in newly diagnosed ALL children was significantly higher than that in the control group ($P<0.01$) and the CR group ($P<0.01$). The expression of *GYPC* gene in the CR group was similar to that in the control group. Other than the control group ($P<0.01$) and the CR group ($P<0.01$), the *GYPC* expression of the relapse group was significantly higher than that in the newly diagnosed group ($P<0.01$). The CR group showed lower *GYPC* gene expression than the non-remission group before treatment ($P<0.05$). Blood expression of *TRIP3* gene in the newly diagnosed and the relapse groups was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). The CR group had increased *TRIP3* gene expression compared with the control group ($P<0.01$) as well as the newly diagnosed and the relapse groups ($P<0.01$). Of the 38 newly diagnosed ALL children, the patients with positive *TRIP3* expression showed higher remission rate than those with negative *TRIP3* ($P<0.05$). The *TRIP3* gene expression before treatment in patients who achieved CR was higher than that in non-remission patients ($P<0.05$). **Conclusions** A high *GYPC* gene expression is associated with an unfavorable outcome, in contrast, a high *TRIP3* gene expression is associated with a favorable outcome in childhood ALL.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (1):29-32]

Key words: Acute lymphoblastic leukemia; Recurrence; Remission; Child

[收稿日期]2008-04-12;[修回日期]2008-06-17
[基金项目]黑龙江省自然科学基金项目资助(D200542)。
[作者简介]张剑白,女,硕士,主任医师。主攻方向:小儿白血病。

目前,对白血病的研究已达基因水平,国内外学者已证实白血病的发生和多种基因异常有关。研究儿童白血病的基因变化,从基因水平阐明其复发与缓解机制,对于临床工作中白血病的诊断、分型、治疗及预后都有重要指导价值。国内外学者研究发现血型糖蛋白 C (glycophorin C, *GYPC*) 基因和甲状腺素受体相互作用蛋白 (thyroid hormone receptor interacting proetin 3, *TRIP3*) 基因与儿童急性淋巴细胞白血病 (ALL) 的复发与缓解有关^[1~4]。本研究采用半定量逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 观察儿童 ALL 初治、缓解及复发患者 *GYPC*, *TRIP3* 基因的表达水平及其与临床的相关性,以探讨二者在预测儿童 ALL 预后方面的价值。

1 材料与方法

1.1 实验对象

所有病例为 2005 年 11 月住院的 ALL 患者,细胞形态学诊断按 French-American-British (FAB) 标准。初治组 38 例,男 23 例,女 15 例,年龄 16 个月至 14 岁,中位年龄 6 岁;完全缓解组 31 例,男 18 例,女 13 例,年龄 2~12 岁,中位年龄 7.5 岁;7 例未缓解,难治组 2 例,均为男孩,分别为 11 岁,14 岁;复发组 12 例,男 9 例,女 3 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:依据《诸福棠实用儿科学》(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

初治患儿和复发患儿于化疗前采集外周血;完全缓解患儿于第一次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, EDTA 抗凝。

1.3 方法

1.3.1 单个核细胞 (MNC) 的制备及细胞总 RNA 的提取 采用 Ficoll 密度梯度离心法收集单个核细胞,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,要求 OD260/OD280 > 1.6。

1.3.2 一步法 RT-PCR 反应 PCR 引物由上海生物工程公司合成。*GYPC* 上游引物为 5'-TC-CCGCGGTCTCTGCCCCG-3', 下游引物为 5'-GTACTCCTTTCTGCTGCTATCAC-3', 扩增片段长度

为 412 bp^[3]。

TRIP3 上游引物为 5'-AGAACAGTGAACCCCT-GAAACTCG-3', 下游引物为 5'-ACTGACCAAGTT-TAACTCCAT -3', 扩增片断长度为 627 bp。

以 β -actin 作为内对照,其上游引物为 5'-GT-TCGCCATGGATGACGATATC -3', 下游引物为 5'-GCCAGATCTTCTCCATGTCGT -3'。扩增片段长度为 220 bp。

反应条件:将装有反应体系的 PCR 管放入 PCR 仪。*GYPC* 基因:48℃ 45 min 1 个循环;94℃ 2 min 1 个循环;94℃ 30 s, 62℃ 1 min, 72℃ 2 min 40 个循环, 72℃ 7 min 1 个循环;4℃ 储存。*TRIP3* 基因:48℃ 45 min 1 个循环;94℃ 2 min 1 个循环;94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 38 个循环;72℃ 7 min 1 个循环;4℃ 储存。

1.3.3 PCR 产物分析 取 10 μ L 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 *GYPC*、*TRIP3* 和 β -actin 扩增产物的灰度相对比值来表示 *GYPC*、*TRIP3* 的表达水平。

1.4 统计学分析

所得实验数据经正态性检验表明总体符合正态分布,计量资料以均数加减标准差表示 ($\bar{x} \pm s$)。采用方差分析多重比较 Dunnet-*t* 检验、SNK-*q* 检验;计数资料采用非参数检验 Fisher 精确概率及相关分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。数据处理用 SPSS 14.0 统计软件。

2 结果

2.1 *GYPC*, *TRIP3* 在不同病期儿童 ALL 中的表达

分析不同组别 *GYPC*, *TRIP3* 基因表达的分布,结合正常对照组的表达将 *GYPC*/ β -actin、*TRIP3*/ β -actin 比值 ≥ 0.7 定义为 *TRIP3* 基因表达阳性 (表 1, 2 及图 1, 2)。

表 1 儿童 ALL 患者不同病期 *TRIP3* 基因表达水平的比较

分组	阳性例数/例数	<i>TRIP3</i> / β -actin 比值
对照	16/20	1.056 $\pm$ 0.166
初治	12/36	0.810 $\pm$ 0.114 ^a
复发	3/12	0.733 $\pm$ 0.057 ^b
缓解	21/25	1.314 $\pm$ 0.195 ^a

a: 与对照组比较, $t = 3.094, 6.032, P < 0.01$; b: $t = 2.969, P < 0.05$

表2 儿童 ALL 患者不同病期 *GYPC* 基因表达水平的比较

分组	阳性例数/例数	<i>TRIP3</i> /β-actin 比值	<i>t</i>	<i>P</i>
对照	6/20	0.752 ± 0.042		
初治	24/36	1.351 ± 0.612	8.30	< 0.01
复发	11/12	1.556 ± 0.145	10.52	< 0.01
缓解	10/25	0.802 ± 0.184	0.875	< 0.01

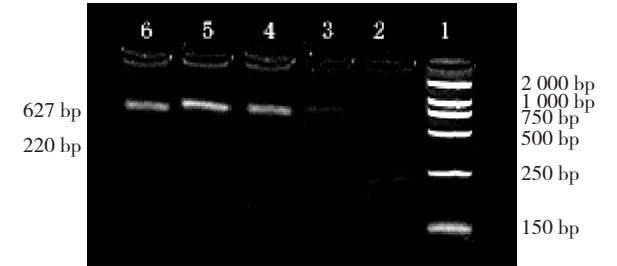


图1 儿童 ALL *TRIP3* 基因的表达
1. Marker2000;2. 内参照 β-actin;4. 正常对照;3,5,6 为同一患儿初治、缓解及复发时基因表达。

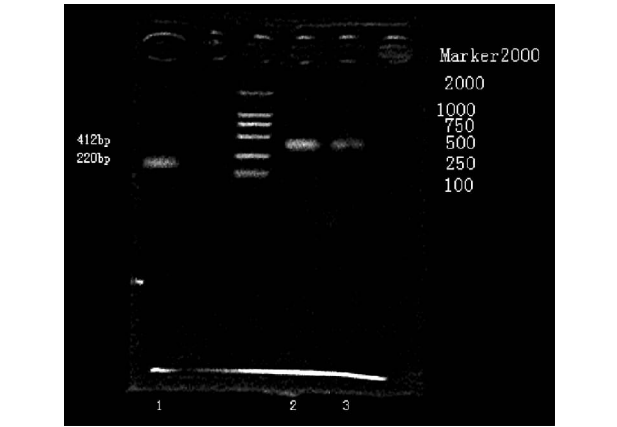


图2 儿童 ALL *GYPC* 基因的表达
1. 内参照 β-actin;2,3 为部分阳性患儿。

半定量后采用多重比较 SNK-q 检验进行各组间两两比较可见 *TRIP3* 基因:初治组与复发组基因表达水平差异无显著性;缓解组的 *TRIP3* 基因表达水平明显高于初治组 ($q = 14.4, P < 0.01$;)与复发组 ($q = 8.42, P < 0.01$;) ,差异有显著性。 *GYPC* 基因:初治组 *GYPC* 表达水平明显高于完全缓解组 ($q = 9.17, P < 0.01$),复发组 *GYPC* 表达水平明显高于完全缓解组 ($q = 11.79, P < 0.01$);也高于初治组 ($q = 3.92, P < 0.01$), 难治患儿 2 例, *GYPC* 表达水平分别为 1.67, 1.75, 均为高表达。

2.2 *GYPC*、*TRIP3* 与儿童 ALL 完全缓解率的关系

38 例初治 ALL, *GYPC* 阳性 24 例, 完全缓解 18

例; *GYPC* 阴性 14 例, 完全缓解 13 例, *TRIP3* 阳性 23 例, 完全缓解 21 例; *TRIP3* 阴性 15 例, 完全缓解 10 例。在治疗强度基本相同的情况下, *GYPC* 阳性患者的完全缓解率与 *GYPC* 阴性者无明显差异 (分别为 75.0%、92.9%, $P > 0.05$), *TRIP3* 阳性患者的完全缓解率与 *TRIP3* 阴性者有差异 (分别为 66.7%、91.3%, $P < 0.05$)。

初治 ALL 38 例, 31 例缓解, 7 例未缓解, 治疗前 *GYPC* 表达水平, 完全缓解组低于未缓解组 (表 3); 治疗前 *TRIP3* 表达水平, 完全缓解组高于未缓解组 (表 4)。

2.3 *GYPC* 与 *TRIP3* 的关系

38 例初治 ALL, *GYPC*, *TRIP3* 均为阳性 15 例; *TRIP3* 阳性、*GYPC* 阴性 8 例; *TRIP3* 阴性、*GYPC* 阳性 9 例; *GYPC*, *TRIP3* 均为阴性 6 例。在测定方法相同的情况下, 患者 *GYPC* 表达阳性率与 *TRIP3* 表达阳性率性无明显差异 (表 5)。

表3 缓解组与未缓解组治疗前 *GYPC* 表达水平

组别	阳性例数/例数	治疗前 <i>GYPC</i> 表达水平
缓解	18/31	1.300 ± 0.150
未缓解	6/7	1.481 ± 0.140 ^a

a: 与缓解组比较, $t = 2.58, P < 0.05$

表4 缓解组与未缓解组治疗前 *TRIP3* 表达水平

组别	阳性例数/例数	治疗前 <i>TRIP3</i> 表达水平
缓解	21/31	0.981 ± 0.123
未缓解	2/7	0.742 ± 0.061 ^a

a: 与缓解组比较, $t = 4.96, P < 0.05$

表5 *TRIP3* 与 *GYPC* 的关系

分组	<i>GYPC</i> 阳性	<i>GYPC</i> 阴性	合计
<i>TRIP3</i> 阳性	15	8	23
<i>TRIP3</i> 阴 性	9	6	15
合计	24	14	38

3 讨论

GYPC 基因定位于 2 号染色体长臂上, 在红系及非红系中均可表达。非红系中, 在淋巴细胞、单核细胞、甚至髓系细胞上均有表达, 而且与血型无关^[6,7]。国外研究发现一些肿瘤抑制蛋白, 如人淋巴细胞肿瘤抑制蛋白 (Hdlg)、脑肿瘤抑制蛋白, 可通过特定的结合位点与 *GYPC* 结合, 推测在肿瘤发生过程中, 肿瘤抑制蛋白和 *GYPC* 间的相互作用导致了 *GYPC* 表达水平的变化, 具体的作用机制目前

尚不清楚^[8,9]。关于 *GYPC* 在造血恶性肿瘤方面的研究国内外开展得不多,相关报道表明:*GYPC* 在白血病细胞中具有高表达,特别是在 ALL 细胞系 Molt-4 和 Brukitts Daudi 具有高表达,说明 *GYPC* 在复发的 ALL 细胞中具有高表达^[10]。

我们发现,初治患者 *GYPC* 表达水平明显高于正常对照组 ($P < 0.01$) 和完全缓解患者 ($P < 0.01$);完全缓解患者 *GYPC* 表达水平与对照组无明显差异 ($P > 0.05$),复发患者 *GYPC* 表达水平不仅高于正常对照组 ($P < 0.01$) 和完全缓解患者 ($P < 0.01$),也高于初治患者 ($P < 0.01$),而难治患者 *GYPC* 均为高表达,这说明在 ALL 的病程中,初次治疗时 *GYPC* 的表达水平较高,完全缓解后 *GYPC* 表达水平下降或测不出,复发时 *GYPC* 表达水平又上升,而难治患者 *GYPC* 持续高表达,所以监测 *GYPC* 表达水平的变化可以反映儿童 ALL 的病情变化。本实验中,*GYPC* 表达阳性 24 例患儿中,缓解 18 例,完全缓解率为 75.0%;表达阴性 14 例,缓解 13 例,完全缓解率为 92.9%,经统计学处理,二者无差异 ($P > 0.05$),但从本实验来看,*GYPC* 阳性者与 *GYPC* 阴性者 CR 率相差很多(分别为 75.0%,92.9%),由此推断在总体趋势上,*GYPC* 阳性者完全缓解率要低于 *GYPC* 阴性者,本实验中无统计学意义,考虑和样本例数少有关。进一步研究表明,完全缓解组治疗前 *GYPC* 的表达水平低于未缓解组 ($P < 0.05$),说明 *GYPC* 不表达或低表达者疗效好,反之则疗效差。总之,*GYPC* 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、评估预后的一个有用的指标。

1995 年 Lee 等^[3]用酵母双杂交技术,以大鼠 TR 为诱饵,筛选到一组阳性克隆,称为甲状腺激素相互作用蛋白 (TRIPS),其表达产物可增强(抑制)核受体转录激活效应。*TRIP3* 基因是甲状腺激素与甲状腺激素受体结合的辅助激活因子。

通过我们研究证明,不同病期的 ALL 患儿 *TRIP3* 基因的表达水平及阳性率有显著差异 ($P < 0.01$)。在完全缓解组 *TRIP3* 基因的表达水平明显增高,而在复发的 ALL 中 *TRIP3* 基因的表达水平明显低于完全缓解组及对照组,这与国内外研究报道相一致。另外我们还发现在初发的 ALL 中 *TRIP3* 基因的表达水平相对高者其缓解率明显高于不表达者或表达水平低者 ($P < 0.01$)。我们推测 *TRIP3* 基因与白血病缓解有关,其可能的机制为:*TRIP3* 基因

与甲状腺激素受体结合后可促进甲状腺激素的作用,且呈剂量依赖性,从而诱导白血病细胞铁蛋白的表达增加,促使肿瘤细胞凋亡。但 *TRIP3* 基因与 TR 间相互作用的方式还有待于进一步研究。

总之,通过实验我们发现 *GYPC*,*TRIP3* 的表达水平随儿童 ALL 的病情发展而变化,二者作用机制不同,无相关性。*GYPC* 可能是儿童 ALL 的不利因素,*GYPC* 高表达者疗效差,易复发,可以作为判断疗效、预测复发、评估预后的一个因素;*TRIP3* 基因则与其相反,*TRIP3* 高表达者对化疗药物反应敏感,易于缓解,*TRIP3* 基因表达水平可以作为评价急性淋巴细胞白血病患儿的化疗效果及估计预后的一个指标。

[参 考 文 献]

- [1] Boyse J, Hewitt M, Mott MG. Glycophorin A mutations and risk of secondary leukaemia in patients treated for childhood acute lymphoblastic leukaemia [J]. Br J Haematol, 1996, 93 (1): 117-124.
- [2] Villeval JL, Le Van Kim C, Bettaieb A. Early expression of glycophorin C during normal and leukemic human erythroid differentiation [J]. Cancer Res, 1989, 49(10): 2626-2632.
- [3] Lee JW, Choi HS, Gyuris J, Brent R, Moore DD. Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor [J]. Mol Endocrinol, 1995, 9(2): 243-254.
- [4] 周密, 廖清奎, 李丰益, 罗春华, 李强. 甲状腺激素 T3 诱导 K562 细胞铁蛋白表达与细胞凋亡和生长的关系 [J]. 实用儿科临床杂志, 2002, 17(2): 90-93.
- [5] Daniels G, King MJ, Avent ND, Khalid G, Reid M, Mallinson G, et al. A point mutation in the *GYPC* gene results in the expression of the blood group Ana antigen on glycophorin D but not on glycophorin C: further evidence that glycophorin D is a product of the *GYPC* gene [J]. Blood, 1993, 82(10): 3198-3203.
- [6] Robinson J, Seiff C, Delia D, Edwards PA, Greaves M. Expression of cell-surface HLA-DR, HLA-ABC and glycophorin during erythroid differentiation [J]. Nature, 1981, 289(5793): 68-71.
- [7] Greaves MF, Chan LC, Furlly AJ, Watt SM, Molgaard HV. Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia [J]. Blood, 1986, 67(1): 1-11.
- [8] Marfatia SM, Leu RA, Branton D, Chishti AH. Identification of the protein 4.1 binding interface on glycophorin C and p55, a homologue of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein [J]. J Biol Chem, 1995, 270(2): 715-719.
- [9] Lofthouse JT. Evidence for age-related deamidation reactions in erythrocyte p55 and glycophorins C and D: implications for signal transduction involving tumour-suppressor proteins in higher eukaryotes [J]. Med Hypotheses, 1998, 51(4): 321-324.
- [10] 卢学春, 楼方定, 徐周敏. 急性淋巴细胞白血病复发相关基因的筛选及生物信息学分析 [J]. 军医进修学院学报, 2004, 25 (2): 81-82.

(本文编辑: 吉耕中)