

[文章编号] 1000-4718(2008)11-2171-04

## 急性白血病患者骨髓细胞 nucleostemin 基因的表达与其类型、疗效的关系\*

童秀珍<sup>1</sup>, 邹外一<sup>1</sup>, 卜珊珊<sup>2</sup>, 汪延生<sup>1</sup>, 李娟<sup>1</sup>, 罗绍凯<sup>1</sup>, 陈运贤<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 中山大学附属第一医院血液科, 广东 广州 510080; <sup>2</sup> 河南省肿瘤医院, 河南 郑州 450000)

**[摘要]** 目的: 探讨 nucleostemin(NS)基因在急性白血病中的表达及临床意义。方法: 采用荧光定量 PCR 的方法检测 67 例急性白血病患者骨髓细胞 nucleostemin 基因表达, 分析其表达与临床的关系。结果: 初治急性白血病患者 nucleostemin 基因的表达水平高于完全缓解组、正常对照组 ( $P < 0.01$ ), 急性淋巴细胞白血病(ALL)患者 nucleostemin 表达水平低于急性非淋巴细胞白血病(ANLL)患者 ( $P < 0.05$ ), ANLL 中 M2、M3、M4、M5 患者 nucleostemin 表达进行两两比较无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 急性白血病患者 nucleostemin 表达水平与性别、年龄、肝、脾肿大和外周血白细胞数无明显相关 ( $P > 0.05$ ), nucleostemin 基因高表达的急性白血病患者症状完全缓解(CR)率低于低表达的患者 (51.3% vs 83.3%,  $P < 0.05$ ), 急性白血病患者治疗达完全缓解者 nucleostemin 呈低表达, nucleostemin 持续高表达或下降后又上升的患者呈现难治及复发。结论: Nucleostemin 基因在急性白血病细胞中高表达, 可作为疗效评价及监测残留病灶的指标。

**[关键词]** 骨髓细胞; 基因; 核干细胞因子; 白血病

**[中图分类号]** R733.71 **[文献标识码]** A

## Correlation between the expression level of nucleostemin gene in marrow cells of the patients with acute leukemia and its clinical types, therapy efficacy

TONG Xiu-zhen<sup>1</sup>, ZOU Wai-yi<sup>1</sup>, BU Shan-shan<sup>2</sup>, WANG Yan-sheng<sup>1</sup>, LI Juan<sup>1</sup>, LUO Shao-kai<sup>1</sup>, CHEN Yun-xian<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Sun-Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

<sup>2</sup> Henan Provincial Cancer Hospital, Zhengzhou 450000, Chian. E-mail: tongxz05@163.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate nucleostemin gene expression in bone marrow of acute leukemia and its clinical significance. **METHODS:** The expression of nucleostemin in 67 acute leukemia patients was detected by fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). The correlation between the expression level of nucleostemin gene and clinical significance was analyzed. **RESULTS:** Significantly higher expression levels of nucleostemin gene were detected in the initially-treated acute leukemia patients than those in normal control group and complete remission (CR) group by FQ-PCR ( $P < 0.01$ ). The expression level of nucleostemin gene in the cells from ALL was significantly lower than that of the cells in ANLL ( $P < 0.05$ ). No significant difference of nucleostemin expression in various differentiation stages (M2, M3, M4, M5) of ANLL was found ( $P > 0.05$ ). No significant association was observed between nucleostemin expression levels and age, sex, hepatomegaly, splenomegaly, WBC count of acute leukemia patients by logistic analysis. The patients with positive expression of nucleostemin had significantly lower complete remission rate than those with negative expression (51.3% vs 83.3%,  $P < 0.05$ ). The nucleostemin expression level was significantly reduced during complete remission. Long-term follow-up of nucleostemin expression level showed that continuous or significant increase in nucleostemin expression in acute leukemia patients predicts refractoriness and impending relapse. **CONCLUSION:** Expression level of nucleostemin in acute leukemia patients is obviously higher than that in normal control. Nucleostemin can be a marker for evaluating therapy efficacy and monitoring minimal residual diseases (MRD) in leukemias.

**[KEY WORDS]** Bone marrow cells; Genes, nucleostemin; Leukemia

[收稿日期] 2007-11-12 [修回日期] 2008-03-19

\* [基金项目] 广东省自然科学基金资助项目 (No. 07001661)

Tel: 020-87755766-8911; E-mail: tongxz05@163.com

2002年, Tsai等<sup>[1]</sup>首次在大鼠胚胎干细胞、中枢神经干细胞和处于分化早期的骨髓细胞研究中发现了 nucleostemin(NS) 基因, 进一步研究发现 NS 基因高表达于某些实体肿瘤细胞中, 其异常表达与实体瘤的发生、发展有关<sup>[2]</sup>, 而在急性白血病方面的研究处于刚刚起步<sup>[3]</sup>, 急性白血病 nucleostemin 基因的表达与临床特征、疗效的关系报道较少见, 因此, 我们采用荧光定量 PCR 检测急性白血病患者 nucleostemin 基因表达, 分析其表达水平与临床的关系。

## 材 料 和 方 法

### 1 研究对象

**1.1 一般资料** 67例急性白血病病人, 其中男33例, 女34例, 中位年龄35(14-60)岁。所有病例经骨髓细胞形态学、组织化学染色及免疫学分型、部分行融合基因检测确诊。其中初治急性白血病患者55例, 包括急性淋巴细胞白血病(ALL)15例, 急性非淋巴细胞白血病(ANLL)40例(M2 10例, M3 8例, M4 8例, M5 14例)。完全缓解患者12例。18例非恶性血液病患者正常骨髓象的骨髓为对照组。ANLL(除M3)患者诱导化疗方案为蒽环类药物(米托蒽醌或柔红霉素)联合阿糖胞苷, ALL患者为VDCP方案(长春新碱, 柔红霉素, 环磷酰胺, 强的松)。

**1.2 白血病细胞株来源** K562细胞株取自中山大学肿瘤防治中心。

### 2 方法

**2.1 细胞总 RNA 和逆转录反应** 收集培养的 K562 细胞及应用淋巴细胞分离液分离急性白血病患者骨髓及正常骨髓的骨髓细胞, 采用 Trizol (Gibco) 提取总 RNA, 经紫外分光光度计测定  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  比值, 鉴定 RNA 纯度及定量, 逆转录反应体系 25  $\mu\text{L}$ , 包括 2  $\mu\text{g}$  RNA, 下游引物 15 pmol, 5  $\times$  缓冲液 5  $\mu\text{L}$ , 10 mmol dNTPs 1.5  $\mu\text{L}$ , RNasin 25U, M-MLV200U, 反应条件: 37 $^{\circ}\text{C}$  1 h, 95 $^{\circ}\text{C}$  5 min 灭活逆转录酶。

**2.2 引物和探针的设计、合成** 根据 GenBank NS cDNA 序列[BC001024]设计并合成引物, nucleostemin 基因上游引物为 5' - TCGGGCAAACAGAAT-TCAAA - 3', 下游为 5' - AGAGGATCTCTGGCATC-CAA - 3', 荧光标记探针序列为 5' FAM - AAGCCTC-CGATGTTGCTAGAGG - TAMARA - 3'。内对照 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)上游引物为 5' - GAA GGTGAAGGTCGGAGT C - 3', 下游引物 5' - GAAGATGGTGATGGGATT TC - 3', GAPDH 探针序列 5' FAM - CAAGCT TCCC GTTCTCAGCC - TAMARA - 3', 引物和探针由北京索奥生物有限公司合成。

**2.3 RT-PCR 检测** PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ , 包含 10  $\times$  PCR 缓冲液 5  $\mu\text{L}$ , 15 pmol 上下游引物, 10 mmol/L dNTPs 1  $\mu\text{L}$ , 3U Taq 聚合酶, 逆转录 cDNA 5  $\mu\text{L}$ 。93  $^{\circ}\text{C}$

3 min 预变性, 93  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 共 35 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。反应后检测, 取 8  $\mu\text{L}$  PCR 扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳。

**2.4 荧光定量 PCR 条件** 参考文献<sup>[4]</sup>进行, 反应混合物(终体积 50  $\mu\text{L}$ )包括 5  $\times$  PCR 缓冲液 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L dNTP 1  $\mu\text{L}$ , 荧光探针 7.0 pmol, Taq DNA 聚合酶 3 U, 模板 cDNA 5  $\mu\text{L}$ 。按  $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0 \times 10^6$  copies/L 梯度稀释, 并同理稀释阳性定量模板(3-磷酸甘油醛脱氢酶, GAPDH), 加入不同的反应管中。扩增条件为: 93  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 93  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 40 个循环。通过荧光定量 PCR 仪中的软件作图及定量标本。

**2.5 DNA 测序** 使用 ABI310 型 DNA 测序仪(PE, 美国)将 PCR 检测 nucleostemin 阳性标本的扩增产物进行 DNA 测序。

**2.6 Nucleostemin 基因表达计算方法** 所有被检标本直接从 PE7700 型 PCR 扩增仪上读取循环阈值(CT)值, 根据阳性定量标准模板(GAPDH)标准曲线图, 计算得出被检标本 nucleostemin 的绝对拷贝数。用 NS/GAPDH 的 CT 比值作为 NS 基因的相对表达量, 以 K562 细胞的扩增拷贝数  $1 \times 10^{11}$  copies/L, CT 比值 0.730082 为界,  $>0.730082$  为高表达,  $<0.730082$  为低表达。

### 3 统计学处理

用 SPSS 11.5 统计软件处理, 两组样本比较用秩和检验, 多组样本比较用方差分析, 两两比较 LSD 检验, 多因素分析用 Logistic 回归分析。

## 结 果

### 1 急性白血病患者骨髓细胞 nucleostemin 基因的表达

**1.1 RT-PCR 法检测** 结果显示, 80.6% 初治急性白血病患者骨髓白血病细胞和 K562 细胞株的 nucleostemin 基因表达为阳性, 正常对照组 nucleostemin 基因表达为阴性或微弱性, 见图 1。

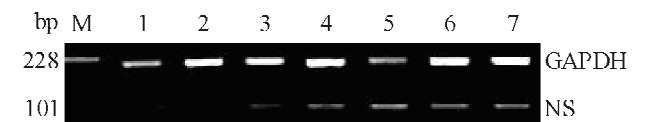


Fig 1 Electrophoresis of NS gene in acute leukemia patients with RT-PCR amplification. Lane 1-2: normal bone marrow; Lane 3-5: acute leukemia; Lane 6-7: K562 cell lines; M: marker.

图 1 急性白血病细胞 RT-PCR 扩增电泳图

**1.2 荧光定量 PCR 法** 结果见图 2, 67 例急性白血病患者中初诊组 55 例, 完全缓解(CR)组 12 例, 对照组 18 例, 经 GAPDH 校正后, 其 nucleostemin 表达水平分别为  $0.8028 \pm 0.1347$ 、 $0.4727 \pm 0.1666$ 、 $0.4253 \pm 0.1514$ , 初诊组 nucleostemin 表达水平分别与完全缓解组及对照组比较差异显著( $P < 0.01$ ,  $P <$

0.01), 而对照组与完全缓解组之间比较差异无显著 ( $P > 0.05$ ), 即初诊急性白血病患者 nucleostemin 表达水平明显高于完全缓解组及对照组。

## 2 DNA 测序结果

阳性标本的扩增产物进行 DNA 测序结果与 GenBank 提供的 nucleostemin 序列一致, 见图 3, 表明扩增片段与目的扩增序列完全相符, 达到预期目的。

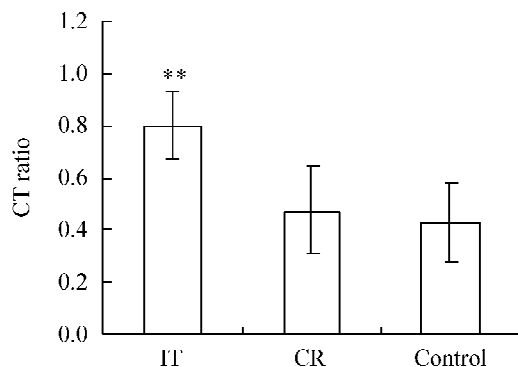


Fig 2 Comparisons of NS expression among initial treated (IT) group ( $n = 55$ ), complete remission (CR) group ( $n = 12$ ) and control group ( $n = 18$ ). \*\*  $P < 0.01$  vs CR group.

图 2 初治组与完全缓解组、正常对照组 nucleostemin 表达比较

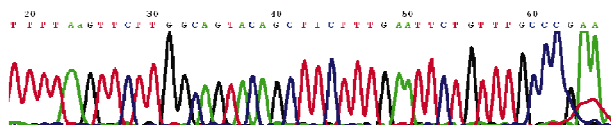


Fig 3 DNA sequence of NS gene in acute leukemia patients

图 3 急性白血病患者 nucleostemin 基因测序

## 3 急性白血病不同亚型之间 nucleostemin 表达水平的比较

ALL、ANLL 患者 nucleostemin 基因的表达水平分别为  $0.7455 \pm 0.2180$ 、 $0.8153 \pm 0.1906$ , ALL 患者 nucleostemin 表达水平低于 ANLL 患者, 差异显著 ( $P < 0.05$ )。ANLL 患者中 M2、M3、M4、M5 表达量分别为  $0.9100 \pm 0.2426$ 、 $0.8161 \pm 0.0802$ 、 $0.8225 \pm 0.1637$ 、 $0.8124 \pm 0.1536$ , 进行两两比较无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

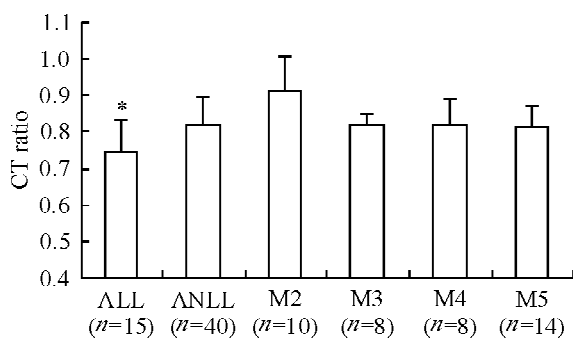


Fig 4 Comparison of nucleostemin expression in different types of acute leukemia patients. \*  $P < 0.05$  vs ANLL group. ALL: acute lymphocytic leukemia; ANLL: acute non-lymphocytic leukemia.

图 4 不同类型急性白血病患者 nucleostemin 表达水平比较

## 4 急性白血病患者 nucleostemin 表达与临床的关系

分析急性白血病患者 nucleostemin 表达水平与性别、年龄、肝、脾肿大、外周血白细胞数、FAB 分型的相关性, 结果显示: 急性白血病患者性别、年龄、肝、脾肿大和外周血白细胞数与 nucleostemin 表达水平无明显相关 ( $P > 0.05$ ), 与 FAB 分型有关 ( $P < 0.05$ )。

## 5 急性白血病患者 nucleostemin 表达与疗效的关系

37 例 NS 基因高表达的急性白血病患者经诱导化疗后完全缓解率 (CR) 为 51.3%, 而 18 例 nucleostemin 基因低表达者 CR 为 83.3%, NS 基因高表达急性白血病患者 CR 低于 nucleostemin 基因低表达的患者, 差异显著 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 急性白血病患者 nucleostemin 表达与疗效的关系  
Tab 1 Relationship between NS expression and therapy efficacy for acute leukemia patients

Group	n	Complete remission (%)	Partial remission (%)	No remission (%)
High NS expression	37	51.3	10.8	29.7
Low NS expression	18	83.3*	11.1	5.5

\*  $P < 0.05$  vs high NS expression group.

## 6 急性白血病患者 NS 基因表达动态观察

对 6 例初治急性白血病患者, 追踪观察 1 个月、6 个月、12 个月时其 nucleostemin 表达水平的动态改变。例 1-3 持续完全缓解者, nucleostemin 基因表达量保持较低水平, 而例 4、例 5 在完全缓解后明显降低, 但又进行性升高, 患者临床表现为复发。例 6 M5 患者初治时及化疗后 nucleostemin 基因表达量始终处于高水平, 临床表现为难治, 未获缓解。

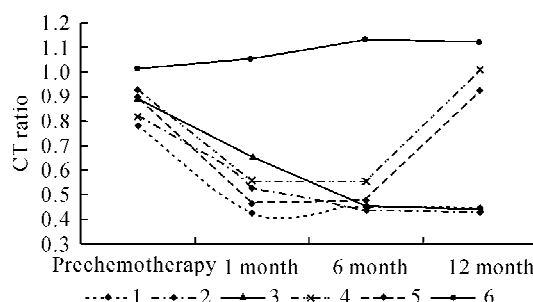


Fig 5 Dynamic change of NS expression for 6 cases of acute leukemia patients.

图 5 6 例急性白血病患者 nucleostemin 表达的动态变化

## 讨 论

Nucleostemin 基因可表达于某些实体肿瘤细胞如膀胱癌、肝癌中, 而在正常分化成熟组织中多无表达<sup>[2]</sup>, nucleostemin 基因在维持癌细胞的自我更新能力和促进细胞增殖方面发挥重要作用。Nucleostemin 基因在血液系统中的表达情况, 正常骨髓细胞仅表

达极微量 nucleostemin 基因<sup>[3]</sup>,进一步研究显示未分化的骨髓间充质干细胞中有低表达<sup>[5]</sup>,在成熟 B 淋巴细胞系(B220+)和粒系细胞(Gr-1-p+)中阴性表达<sup>[1]</sup>,nucleostemin 基因调控骨髓干细胞的自我更新与增殖<sup>[6]</sup>,在白血病细胞株(K562、U937)<sup>[7]</sup>高表达,本研究结果 RT-PCR 法显示 80.6% 初治急性白血病患者骨髓白血病细胞和 K562 细胞株的 nucleostemin 表达为阳性,正常对照组 nucleostemin 表达为阴性或微弱性,与文献报道<sup>[3]</sup>相一致,我们进一步用准确性和特异性均较好的荧光定量 PCR 法进行 nucleostemin 基因定量,正常骨髓细胞表达量远远低于急性白血病,我们的结果再次显示 nucleostemin 基因高表达于急性白血病中,有望从 nucleostemin 基因入手,揭示急性白血病细胞异常增殖克隆的机制,尝试对急性白血病进行基因靶向治疗的可能。

Nucleostemin 基因异常表达在急性白血病发病中的作用尚不清楚,有可能通过下列途径参与作用,(1) nucleostemin 与抑癌基因 p53 有着密切的关系,由于 nucleostemin 的持续高表达,P53 无法脱离 NS-GTP 蛋白复合物,其生长抑制功能持续受抑,进一步用 nucleostemin 基因的特异性 RNA 干扰研究证实 nucleostemin 基因通过其 GTP 结合基序将细胞阻断在细胞分裂周期的 S 期,并降低 caspase 3 的表达,通过其 N 末端的碱性结构域与 P53 相互作用,细胞持续增殖,导致急性白血病的形成<sup>[8-10]</sup>;(2) nucleostemin 可以促进端粒结合蛋白(TRF1)的降解,使分裂细胞减少端粒损耗,从而导致细胞的持续分裂增殖<sup>[11]</sup>。

进一步探讨 nucleostemin 基因的改变与急性白血病的分型关系,结果显示, nucleostemin 表达水平在 ANLL 中远远高于 ALL,提示不同类型的急性白血病其 nucleostemin 基因表达不同,是否能作为临床上急性白血病类型的鉴别指标之一,有待于进一步扩大病例数证实。

我们首次分析初治急性白血病患者的 nucleostemin 基因表达的临床意义,我们的研究显示 nucleostemin 表达水平与肝大、脾大、淋巴结肿大、白细胞数无关,这与文献报道的急性白血病中肿瘤标志物的表达量均与临床浸润症状无相关性<sup>[12]</sup>是相符的。

Nucleostemin 基因高表达的完全缓解率低于 nucleostemin 低表达者,初步表明,急性白血病患者 nucleostemin 表达水平与疗效有关,追踪观察急性白血病患者 nucleostemin 表达水平的动态改变,持续完全缓解者 nucleostemin 基因表达量保持较低水平;完全缓解后低表达但又进行性升高患者临床表现为复发;初治时及治疗后 nucleostemin 基因表达量始终处于高水平,临床表现为难治,未获缓解,我们的初步

结果提示应用荧光定量 PCR 技术定期检测 NS 表达水平可作为微小残留病灶监测和预后判断的指标。

总之,nucleostemin 基因在急性白血病细胞中高表达,可作为疗效评价及监测残留病灶的指标。

[参 考 文 献]

[1] Tsai RY, McKay RD. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells[J]. *Genes Dev*, 2002,16(23):2991-3003.

[2] Liu SJ, Cai ZW. Role of nucleostemin in growth regulation of gastric cancer, liver cancer and other malignancies[J]. *World J Gastroenterol*, 2004,10(9):1246-1249.

[3] 岳保红,孙玲,赵小强,等.核干细胞因子基因在急性白血病细胞表达的检测和意义[J]. *中华检验医学杂志*, 2006,29(4):324-327.

[4] Tong XS, Meng ZF. Identification of recombinant baculovirus and determination of virus titer with fluorescence quantitative PCR assay[J]. *中国病理生理杂志*, 2007,23(8):1623-1626.

[5] Yaghoobi MM, Mowla SJ, Tiraihi T. Nucleostemin, a coordinator of self-renewal, is expressed in rat marrow stromal cells and turns off after induction of neural differentiation[J]. *Neurosci Lett*, 2005, 390(2): 81-86.

[6] Beekman C. Evolutionarily conserved role of nucleostemin: controlling proliferation of stem/progenitor cells during early vertebrate development [J]. *Mol Cell Biol*, 2006,26(24):9291-9301.

[7] Han C, Zhang X, Xu W, et al. Cloning of the nucleostemin gene and its function in transforming human embryonic bone marrow mesenchymal stem cells into F6 tumor cells [J]. *Int J Mol Med*, 2005,16(2):205-213.

[8] Robert YL, Tsai RY, McKay RD. A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin[J]. *J Cell Biol*, 2005, 168(2):179-184.

[9] Sijin L, Ziwei C. The effect of knocking-down nucleostemin gene expression on the *in vitro* proliferation and *in vivo* tumorigenesis of HeLa cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2004,23(3):529-538.

[10] Du X. The homologous putative GTPases Grn1p from fission yeast and the human GNL3L are required for growth and play a role in processing of nucleolar pre-rRNA[J]. *Mol Biol Cell*, 2006,17(1):460-474.

[11] Zhu QB, Yasumoto H. Nucleostemin delays cellular senescence and negatively regulates TRF1 protein stability [J]. *Mol Cell Biol*, 2006,26(24):9279-9290.

[12] Van Baren N, Chambost H, Ferrant A, et al. PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukemia cells [J]. *Br J Haematol*, 1998, 102(5):1376-1379.