



白血病细胞来源微粒BCR-ABL mRNA检测在监测慢性髓性白血病治疗反应中的意义

朱晓健 李青 曾辰 仲照东 游泳 邹萍

【摘要】 目的 探讨通过检测白血病细胞来源微粒(MP)BCR-ABL融合基因水平对达完全分子学反应(CMR)后慢性髓性白血病(CML)患者进行分层的可能。**方法** 收集29例不同疾病状态的CML患者,采用实时定量PCR方法分别检测患者外周血细胞与MP中的BCR-ABL mRNA水平。**结果** 患者外周血MP和细胞中均能稳定检测出BCR-ABL mRNA;CMR、主要分子学反应(MMR)、完全细胞遗传学反应(CCyR)三种疾病状态下患者MP中的BCR-ABL mRNA水平分别为 9.1 ± 2.8 、 25.2 ± 6.9 和 62.8 ± 6.3 ,差异具有统计学意义($P < 0.05$);细胞内BCR-ABL转录本为阴性时,来源于同一份样本的MP仍可检测到BCR-ABL mRNA[中位水平 $6.5(3.7\sim 15.3)$];CMR患者MP中BCR-ABL融合基因水平与服药时间呈负相关($r = -0.656, P < 0.05$);在同样达到CMR的前提下,造血干细胞移植组患者和酪氨酸激酶抑制剂治疗组患者相比,MP中BCR-ABL mRNA水平更低(分别为 3.3 ± 2.1 和 $9.1\pm 2.8, P < 0.05$)。**结论** CML患者外周血细胞来源MP中可以稳定检出BCR-ABL mRNA,并有望成为患者达CMR后继续监测的重要指标。

【关键词】 融合蛋白类,BCR-ABL; 细胞源性微粒; 白血病,髓系,慢性,BCR-ABL阳性; 实时聚合酶链反应

Detection of leukemia-derived microparticles in the monitoring of chronic myeloid leukemia Zhu Xiaojian, Li Qing, Zeng Chen, Zhong Zhaodong, You Yong, Zou Ping. Institute of Hematology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China
Corresponding author: You Yong, Email:youunion@163.com

【Abstract】 Objective To exam the role of leukemia cells-derived microparticles in the post-complete molecular response stratification. **Methods** Blood samples from 29 patients diagnosed with chronic myeloid leukemia (CML) were collected. Microparticles (MP) were extracted from the peripheral blood. Real-time PCR was performed to measure the level of BCR-ABL mRNA. **Results** BCR-ABL mRNA could be stably detected both in MP and peripheral blood cells; BCR-ABL in MP showed significant difference within complete molecular response, major molecular response and complete cytogenetic response ($9.1\pm 2.8, 25.2\pm 6.9$ and 62.8 ± 6.3 respectively, $P < 0.05$). BCR-ABL was detected in MP even when it was negative in peripheral blood cells ($3.7\sim 15.3$). For patients with complete molecular response, BCR-ABL in MP but not cells were significantly different between imatinib and stem cell transplant recipients (3.3 ± 2.1 vs $9.1\pm 2.8, P < 0.05$). **Conclusion** This study indicated that MP may serves as a new target for monitoring of CML. Quantification of BCR-ABL in MP may offer a novel strategy for stratification of molecular response.

【Key words】 BCR-ABL; Cell-derived microparticles; Leukemia, myelogenous, chronic, BCR-ABL positive; Real-time polymerase chain reaction

酪氨酸激酶抑制剂(TKI)治疗慢性髓性白血病(CML)已经成为经典的疾病治疗模式,患者长期无

病生存率达90%以上^[1]。BCR-ABL不仅是重要的治疗靶点,同时是关键的疾病状态监测指标:采用实时定量RT-PCR(RQ-PCR)方法检测BCR-ABL mRNA能够准确定义患者的治疗反应及预后评估。目前,TKI能够使绝大部分患者迅速达到稳定的完全分子学反应(CMR)。CMR状态指在特定敏感度RQ-PCR技术检测下不能检查到BCR-ABL mRNA,但并不能等同于临床治愈。最为强大的证

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.02.017

基金项目:国家自然科学基金(81170498)

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院血液病学研究所

通信作者:游泳,Email:youunion@163.com



据之一是停药后大部分患者即出现复发,而一部分则能够继续保持稳定的缓解状态^[2-4]。因此,针对达CMR后的患者,选择合适的指标进行区分,达到分层治疗是当下研究的焦点。微粒(microparticle, MP)是真核细胞活化或凋亡时释放的双层脂质膜小囊泡结构,存在于血浆及各种组织液中。肿瘤细胞来源MP具有多种生物学功能,更为重要的是,MP保留有母体细胞的表型及内容物,是一种良好的特异性生物学标志物^[5]。多个研究表明某些肿瘤细胞本身虽然通过常规手段无法检测到,但其来源的MP却能够在血液中检测到;且一个细胞能够分泌大量MP,具有生物信息级联放大作用,研究这部分MP能够分辨肿瘤细胞的特征(如负荷、细胞来源等)^[6-7]。我们在前期研究中发现,BCR-ABL阳性细胞来源MP同样包含有该融合基因的mRNA,因此本研究中我们探讨了检测CML患者外周血MP BCR-ABL mRNA表达在监测CML治疗反应中的意义。

病例和方法

1. 患者资料:本研究共纳入29例我院血液病学研究所门诊部收治的CML慢性期患者,其中男14例,女15例。患者中位年龄35(10~54)岁,中位服用TKI时间为33(3~82)个月,11例患者经两次RQ-PCR检测均达到CMR,5例患者达主要分子学反应(MMR),5例患者达完全细胞遗传学反应(CCyR),治疗反应标准按照BCR-ABL/ABL拷贝数定义($\leq 1\%$ 为CCyR, $\leq 0.1\%$ 为MMR, $\leq 0.01\%$ 为CMR)。8例患者选择非亲缘异基因造血干细胞移植(allo-HSCT),移植后中位时间为9(3~21)个月,患者均处于移植后无白血病生存期(LFS)。29例患者临床资料见表1。

2. MP的提取和鉴定:为确保研究的稳定性和可靠性,我们利用同一份血样(患者外周血)提取MP及细胞,分别进行RQ-PCR。MP采用梯度离心法获取:离心温度均为4℃,1 000 r/min(离心半径为6 cm)离心5 min,4 000 r/min离心10 min取上清,将该上清再以10 000×g离心1 h获取沉淀物。采用透射电镜鉴定分离物为MP。电镜观察方法:以1%磷钨酸(PTA)1:1混合标记MP,直接吸附到涂抹了溴隐亭的300目铜网上,蒸馏水轻轻冲洗3次,待铜网干后,直接在电子显微镜下观察。

3. RQ-PCR检测BCR-ABL融合基因:本研究中

表1 29例慢性髓性白血病患者临床资料

例号	性别	年龄(岁)	诊断分期	疾病状态	服用TKI时间(月)	MP内BCR-ABL水平
1	女	34	CP	CMR	44	6.3
2	女	30	CP	CMR	26	9.1
3	男	28	CP	CMR	37	10.6
4	女	44	CP	CMR	82	3.5
5	男	38	CP	CMR	55	7.8
6	男	43	CP	CMR	34	15.3
7	男	25	CP	CMR	49	9.7
8	女	45	CP	CMR	47	11.2
9	男	15	CP	CMR	40	8.2
10	女	10	CP	CMR	38	9.4
11	女	44	CP	CMR	37	8.7
12	女	48	CP	MMR	26	15.6
13	女	51	CP	MMR	29	33.7
14	男	44	CP	MMR	33	31.4
15	女	41	CP	MMR	17	25.8
16	女	41	CP	MMR	19	19.5
17	男	34	CP	CCyR	18	55.1
18	女	30	CP	CCyR	12	62.3
19	男	28	CP	CCyR	3	56.8
20	男	44	CP	CCyR	9	71.2
21	男	38	CP	CCyR	11	68.4
22	女	33	CP	移植后7个月	NA	3.1
23	女	26	CP	移植后11个月	NA	1.7
24	男	35	CP	移植后21个月	NA	5.5
25	女	19	CP	移植后18个月	NA	0.0
26	男	35	CP	移植后9个月	NA	3.2
27	男	54	CP	移植后7个月	NA	1.9
28	男	42	CP	移植后3个月	NA	7.1
29	女	29	CP	移植后9个月	NA	4.2

注:CP:慢性期;CMR:完全分子学反应;MMR:主要分子学反应;CCyR:完全细胞遗传学反应;TKI:酪氨酸激酶抑制剂;MP:微粒;NA:未用

BCR-ABL融合基因RQ-PCR检测均由本研究所下属干细胞应用与研究进行,该中心获RQ-PCR检测认证准入资格^[8]。RNA提取采用E.Z.N.ATM Blood RNA试剂盒(美国Omega Biotek公司产品)。逆转录反应采用Moloney murine leukaemia virus Reverse Transcriptase试剂盒(美国Promega公司产品)。实时定量PCR体系为20 μl,包括10 μl SYBR Green PCR Master Mix(美国Applied Biosystems公司产品),2 μl引物(美国Invitrogen公司产品),6.5 μl无RNA酶水,1.5 μl cDNA。荧光强度以Stratagene Mx3000PTM RQ-PCR系统来测定并计算



Ct值。

4. 统计学处理:采用SPSS10.0软件分析处理相关数据,方差齐性的组间对比采用配对 t 检验,三组之间比较采用非参数检验(ANOVA test),两组之间率的比较采用卡方检验,所有数据以均值 \pm 标准差表示,取 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 微粒的鉴定和BCR-ABL检测:6 ml外周血经离心获得上清,上清梯度离心获得的沉淀物以透射电镜观察,镜下可见直径约为0.5 μm 的囊泡,其外层为双层脂质膜结构,包裹一定的细胞质及细胞器组分(图1),符合Meckes等^[5]对MP大小及形态特征的描述,证实我们的提取物主要成分为MP。提取MP中的RNA采用RQ-PCR法进行BCR-ABL融合基因检测,同样采用ABL作为内参基因,其平均拷贝数约 10^2 。MP中的BCR-ABL mRNA水平以BCR-ABL/ABL拷贝数比值表示。

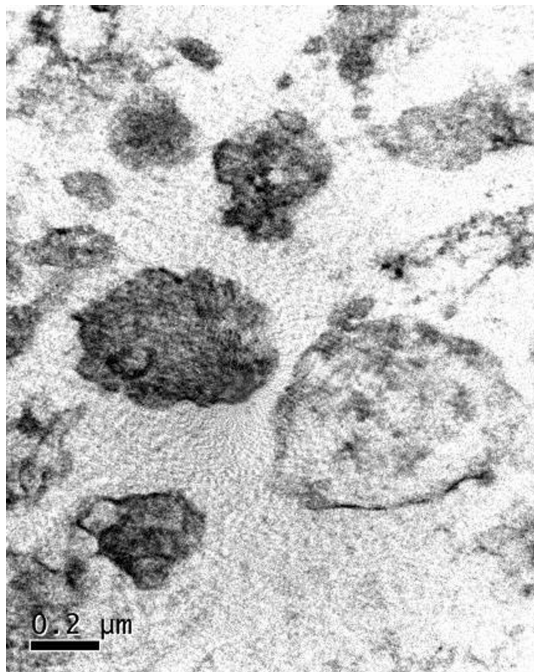


图1 透射电镜下慢性髓性白血病患者外周血微粒的形态

2. 以MP和外周血细胞内BCR-ABL水平监测治疗反应的比较:CMR组11例患者外周血细胞内BCR-ABL基因检测均为阴性,但外周血MP内均仍可检测出BCR-ABL mRNA[中位水平6.5(3.7~15.3)]。CMR组患者MP中的BCR-ABL mRNA水平与患者年龄($t=0.13, P > 0.05$)、性别($P > 0.05$)及服

药前疾病持续时间($t=0.21, P > 0.05$)无明显相关性,但与服用TKI时间呈负相关($t=-0.656, P < 0.05$),提示达到CMR后持续服用TKI仍能够降低MP中BCR-ABL mRNA水平。MMR、CCyR组患者外周血MP中同样均可稳定检出BCR-ABL mRNA,MP中的BCR-ABL mRNA水平在CMR、MMR、CCyR三组分别为 9.1 ± 2.8 、 25.2 ± 6.9 和 62.8 ± 6.3 ,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示基于外周血MP检测同样能够区分患者治疗反应以及所处的状态。MMR组及CCyR组患者外周血细胞中的BCR-ABL mRNA水平与MP中水平呈正相关($t=0.57, P < 0.05$)。在MMR、CCyR组,MP中BCR-ABL水平同样与患者年龄、性别及服药前疾病持续时间无关,与服用TKI时间亦不相关($t=0.051, P > 0.05$)。

allo-HSCT被认为是唯一能够治愈CML的手段,采用allo-HSCT或TKI达到CMR后,细胞内BCR-ABL mRNA已转阴。但我们在研究中发现,allo-HSCT与TKI-CMR组外周血来源MP中的BCR-ABL mRNA水平分别 3.3 ± 2.1 和 9.1 ± 2.8 ,差异具有统计学意义($P=0.003$),提示在已达到CMR的患者,检测MP中的BCR-ABL mRNA水平能够有效地为患者的治疗决策提供依据。同时,由于MP来源于残留白血病细胞,更低的MP提示allo-HSCT能够更为彻底地清除残留白血病细胞。

讨 论

肿瘤细胞来源MP的特征、内容物和生物学功能是近期的研究热点,有报道指出MP参与肿瘤血管新生、免疫逃逸、侵袭转移等几乎所有的生物学行为^[5]。但MP在微小残留病(MRD)中作用和检测意义的相关研究甚少。CMR状态下残留的白血病细胞藏匿在骨髓内,低于RQ-PCR方法的检测下限,导致检测出现假阴性。我们的研究结果表明,在外周血细胞检测为阴性的情况下(CMR状态),MP内仍可检测出BCR-ABL mRNA;其敏感度高于基于外周血细胞的检测,因此有可能应用于CMR后疾病状态的监测。其机制可能有:①MP是母体细胞的缩微版,携带有母体细胞的表面标志及内容物,因此分析MP有可能得到其母体细胞的相关信息,并具有一定的即时性;②单个肿瘤细胞能够释放大量的MP($10^{12} \sim 10^{15}$ 个),具有生物信号的级联放大作用,使得BCR-ABL融合基因在MP中比在细胞中理论上更易检出^[9];③MP的膜结构使其内容物相对血



清中游离的成分具有更强的稳定性,同时相对细胞而言,MP所包含的蛋白及RNA量相对较少,针对特异性靶标的筛选灵敏度更高^[10];④胃癌、乳腺癌、慢性淋巴细胞白血病等相关研究已经证明,患者外周血MP与临床病情演化及预后相关,提示MP能够反映疾病进展^[11-12];⑤更为重要的是,多个研究表明在神经胶质瘤等特殊类型的肿瘤中,瘤细胞本身可能匿藏于病灶局部甚至常规手段无法检测的部位,但其分泌的MP却可出现在外周循环血,并能够通过一定的手段被获取,具有重要的诊断意义^[13]。

进一步分析发现在达到CMR的患者,MP中的BCR-ABL融合基因水平与TKI服用时间呈现负相关,提示在达到CMR情况下继续服用TKI能够进一步降低MP中的BCR-ABL水平,减少疾病演进的可能。在对8例进行allo-HSCT的患者监测过程中发现,即使细胞内拷贝数持续为0,MP内的拷贝数仍随患者的疾病状态和治疗反应波动。当患者出现较为严重的移植物抗宿主病和(或)患者服用TKI时,MP内BCR-ABL融合基因拷贝数显著降低,提示在细胞检测阴性的情况下,检测MP内的BCR-ABL水平能有效反映疾病状态。此外,采用allo-HSCT或TKI达到CMR状态后,缺乏有效的手段对患者的疾病状态进行区分,而基于MP的BCR-ABL融合基因检测能够对达CMR后CML患者进一步分层。

本研究的不足之处是缺乏对肿瘤来源的MP进行特异性富集和纯化的过程,同时本研究为单中心结果。因此肿瘤来源MP的富集、分离以及组织多中心合作等将是我们进一步的工作。

参考文献

[1] Baccharani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27 (35):6041-6051.

[2] Mahon FX, Réa D, Guilhot J, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have main-

tained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(11):1029-1035.

[3] Rousselot P, Huguet F, Rea D, et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years [J]. *Blood*, 2007, 109(1):58-60.

[4] Yhim HY, Lee NR, Song EK, et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myeloid leukemia who have received front-line imatinib mesylate therapy and achieved complete molecular response [J]. *Leuk Res*, 2012, 36(6):689-693.

[5] Meckes DG Jr, Shair KH, Marquitz AR, et al. Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(47):20370-20375.

[6] Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, et al. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer [J]. *Clin Lung Cancer*, 2009, 10(1):42-46.

[7] Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(4):462-469.

[8] Li X, Li X, Xie W, et al. Comprehensive profile of cytogenetics in 2308 Chinese children and adults with de novo acute myeloid leukemia [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2012, 49(2):107-113.

[9] Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication [J]. *Kidney Int*, 2010, 78(9):838-848.

[10] Garcia-Olmo DC, Garcia-Olmo D. Biological role of cell-free nucleic acids in cancer: the theory of genomestasis [J]. *Crit Rev Oncog*, 2013, 18(1-2):153-161.

[11] Ghosh AK, Secreto CR, Knox TR, et al. Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression [J]. *Blood*, 2010, 115(9):1755-1764.

[12] Kalinkovich A, Tavor S, Avigdor A, et al. Functional CXCR4-expressing microparticles and SDF-1 correlate with circulating acute myelogenous leukemia cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(22):11013-11020.

[13] Skog J, Würdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(12):1470-1476.

(收稿日期:2013-11-23)

(本文编辑:王叶青)