

急性髓系白血病患者PTEN、miR-195、BCL-2的表达及临床意义

段永涛,李瑞花

咸阳市中心医院血液内科,陕西 咸阳 712000

【摘要】 目的 探讨人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源蛋白的基因(PTEN)、microRNA-195(miR-195)、B细胞淋巴瘤/白血病-2(BCL-2)等基因的表达在急性髓系白血病(AML)患者中的临床意义。方法 选取咸阳市中心医院2017年1月至2018年11月间收治的60例AML患者作为研究对象,根据病情情况分为初发组(40例)、复发组(8例)、缓解组(12例),并选择60例体检健康成年人作对照组,采用RT-PCR检测两组受检者骨髓中PTEN、miR-195、BCL-2的mRNA及蛋白表达水平,并分析三者的表达与AML的关系。结果 RT-PCR结果显示,初发组患者骨髓单个核细胞中PTEN mRNA、miR-195 mRNA表达量分别为 4.25 ± 1.11 、 1.07 ± 0.23 ,复发组患者分别为 2.91 ± 0.77 、 0.96 ± 0.21 ,复发组的PTEN mRNA、miR-195 mRNA表达量低于初发组,且均低于缓解组患者的 10.53 ± 2.63 、 3.85 ± 1.14 及对照组的 10.76 ± 2.62 、 3.93 ± 0.88 ,差异均具有统计学意义($P<0.05$);初发组患者的骨髓单个核细胞中的BCL-2 mRNA表达量为 9.08 ± 2.08 ,复发组患者为 9.40 ± 2.56 ,复发组的BCL-2 mRNA表达量高于初发组,且均高于缓解组患者的 3.68 ± 1.03 及对照组的 3.24 ± 0.76 ,差异均具有统计学意义($P<0.05$);Spearman相关性分析结果显示,PTEN、miR-195的表达与AML呈负相关($r=-0.694$ 、 -0.735 , $P<0.01$),而BCL-2 mRNA的表达与AML呈正相关($r=0.747$, $P<0.01$)。结论 PTEN、miR-195在AML中表达量低,而BCL-2在AML中表达量高,三者的表达均可作为AML的发生、发展的预测指标,且PTEN、miR-195的表达与AML呈负相关,而BCL-2的表达与AML呈正相关,表明靶向调控PTEN、miR-195,从而抑制BCL-2表达,可作为新的AML基因治疗靶点。

【关键词】 急性髓系白血病;人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源蛋白的基因;microRNA-195;B细胞淋巴瘤/白血病-2;基因表达

【中图分类号】 R733.71 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2019)19-2469-04

Expression and clinical significance of PTEN, miR-195 and BCL-2 in patients with acute myeloid leukemia.

DUAN Yong-tao, LI Rui-hua. Department of Hematology, Xianyang Central Hospital, Xianyang 712000, Shaanxi, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the clinical significance of the expression of genes such as phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN), microRNA-195 (miR-195), and B cell lymphoma/leukemia-2 (BCL-2) in patients with acute myeloid leukemia (AML). **Methods** A total of 60 patients with AML admitted to Xianyang Central Hospital from January 2017 to November 2018 were selected as subjects. According to the condition, they were divided into the initial group (40 cases), the recurrence group (8 cases), and the remission group (12 cases). At the same time, 60 healthy adults were selected as the control group. The mRNA and protein expression levels of PTEN, miR-195, and BCL-2 in the bone marrow of the three groups were detected by RT-PCR, and the relationship between the expression of these three group and AML was analyzed. **Results** The results of RT-PCR showed that the mRNA expression levels of PTEN and miR-195 were 4.25 ± 1.11 and 1.07 ± 0.23 , respectively, in bone marrow mononuclear cells of the initial group, and were respectively 2.91 ± 0.77 and 0.96 ± 0.21 in the recurrent group. The mRNA expression of PTEN and miR-195 were lower in the recurrent group than in the initial group; they were lower than corresponding 10.53 ± 2.63 and 3.85 ± 1.14 in the remission group, and were lower than corresponding 10.76 ± 2.62 and 3.93 ± 0.88 in the control group; all differences were statistically significant ($P<0.05$). The expression of BCL-2 mRNA was 9.08 ± 2.08 in bone marrow mononuclear cells of the initial group, which was 9.40 ± 2.56 in the relapse group. The expression of BCL-2 mRNA was higher in the recurrent group than in the initial group, which was higher than 3.68 ± 1.03 in the remission group and 3.24 ± 0.76 in the control group; both differences were statistically significant ($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed that the expression levels of PTEN and miR-195 were negatively correlated with AML ($r=-0.694$ and -0.735 , respectively; both $P<0.01$), while the expression of BCL-2 mRNA was positively correlated with AML ($r=0.747$, $P<0.01$). **Conclusion** PTEN and miR-195 are expressed in AML with low expression, while BCL-2 is highly expressed in AML. The expression of both can be used as a predictor of the occurrence and development of AML. Moreover, the expression of PTEN and miR-195 is negatively correlated with AML, while the expression of BCL-2 is positively correlated with AML. These indicate that targeting PTEN and miR-195, thereby inhibiting BCL-2 expression, can be used as a new therapeutic target for AML gene therapy.

【Key words】 Acute myeloid leukemia; Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10; microRNA-195; B cell lymphoma/leukemia-2; Gene expression

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是属于白血病的一类恶性血液病肿瘤,其病症为原始髓

系细胞恶性增殖克隆,导致造血功能障碍^[1]。AML的病情急促,转移较快,若未得到有效治疗,患者死亡率

极高,但关于其发病机制尚无定论。研究表明,致癌基因的表达与抑癌基因受抑可能是其发病的重要因素^[2]。目前已探明的具有调控磷酸酶的唯一抑癌基因是人 10 号缺少的磷酸酶和张力蛋白同源蛋白(PTEN)基因,关于其在胃癌、肝癌、肾癌等多种实体肿瘤中的表达缺失的相关研究报道较多,但在血液肿瘤报道中则鲜有报道^[3]。另一种与恶性肿瘤产生及发展有关的基因为 microRNA-195 (miR-195),其作用原理为调控 CyclinD1、Cyclin E1、CDK6、cDc25A 等细胞周期相关蛋白和细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达以发挥其生物特性^[4]。B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(BCL-2)为一类抗细胞凋亡的基因,其通过抑制促癌蛋白的诱导,抵抗细胞凋亡,从而使细胞存活并增殖,其在大部分肿瘤组织表达程度高。但 PTEN、miR-195、BCL-2 三种基因的表达与 AML 的发生、发展的相关性尚处于未知阶段^[5]。基于此,本研究探讨 PTEN、miR-195、BCL-2 三种基因的表达在 AML 中的临床意义,为 AML 的治疗提供参考依据,现报道如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取咸阳市中心医院 2017 年 1 月至 2018 年 11 月间收治的 AML 患者 60 例作为研究对象,选择 60 例体检健康成年人作为对照组,AML 患者中男性 33 例,女性 27 例;年龄 35~68 岁,平均(51.2±1.4)岁;初治患者 40 例,缓解患者(化疗后,原始骨髓细胞的数量比例<5%) 12 例,复发患者(化疗后原始骨髓细胞数量比例>20%) 8 例;根据 WHO 诊断标准分为 M0、M1、M2、M3、M4、M5 6 型,每型依次为 10 例、7 例、22 例、9 例、8 例、4 例。本研究经本院伦理委员会批准,所有患者家属及对照组受检者对本研究均知情,且签署知情协议书。纳入标准:经细胞形态学、免疫分型、组织化学染色法等手段诊断为 AML 患者;研究期间不化疗仅使用阿糖胞苷及柔红霉素治疗患者。排除标准:慢性白血病、淋巴系白血病及其他血液病患者;合并代谢性疾病或感染性疾病患者或心、脑血管疾病患者;精神病患者。

1.2 方法

1.2.1 主要仪器与试剂 兔抗人 PTEN、miR-195、BCL-2、GAPDH 多克隆抗体(美国 Abcam 公司);反转录试剂盒 Prime Script RT Reagent Kit (大连宝生物公司);Ultra SYBR Mixture (康为世纪生物科技有限公司);实时荧光定量 PCR 检测仪及 Gel Doc XR System 凝胶成像系统(美国伯乐公司);Nanodrop1000 核酸蛋白检测仪(美国 Nanodrop 公司)。

1.2.2 单个骨髓核细胞采集及处理 所有受检者均抽取清晨空腹状态下的外周血。采集骨髓样本后用肝素行抗凝处理,并随即用 2 倍量的磷酸盐缓冲液(PBS)稀释骨髓样本,然后向分离试管中加入一定量

的淋巴细胞分离液,再缓慢向分离试管中加入细时候的骨髓样本,室温下 670.8×g 离心处理 30 min,得到 4 层细胞分离液,从上至下分别是透明浅黄色、白色、无色、红色层,用毛细吸管将第 2 层的白色层细胞分离液缓慢吸取,得到的分离液用等量 PBS 洗涤,室温下 1 006.2×g 离心处理 5 min,所得即为单个核细胞层。

1.2.3 PTEN、miR-195、BCL-2 mRNA 表达的 RT-PCR 检测 严格按照 TRIzol 法对单个核细胞的总 RNA 进行提取,并检测其纯度和完整度。 $OD_{260}/OD_{280}>1.6$ 代表 RNA 纯度高。用反转录试剂盒对 RNA 行反转录得到 cDNA,以得到的 cDNA 为模板,寻找相应反应引物,再用 RT-PCR 进行扩增,获取 CT 值,并采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析扩增结果。反应具体体系:1 μL 模板,1 μL 上游引物,1 μL 下游引物,12.5 μL Ultra SYBR Mixture, 8.5 μL 蒸馏水。PTEN:上游引物:5'-TACAAGCTTCTCCCAGACATGACAGCCATC-3', 5'-TGGATTCTCACACTTTTGTAATTTGTGTATG-3'; miR-195: 5'-CGTAGCAGCACAGAAATATTGGC-3',下游引物 5'-CCAGTCTCAGGGTCCGAGGTATTC-3'; BCL-2: 上游引物:5'-TGAAACCGGCATCTGCACAC-3',下游引物:5'-CGTCTTCAGAGACAGCCAGGAC-3'。反映具体过程:预变性 30 s, 98℃;变性 5 s, 95℃;退火 30 s, 50℃;延伸 30 s, 72℃。

1.3 统计学方法 应用 SPSS22.0 统计软件处理数据,计量资料符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验;相关性采用 Spearman 相关分析,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PTEN、miR-195 和 BCL-2 mRNA 的表达水平比较 RT-PCR 结果显示,所有受检者骨髓单个核细胞中的 PTEN mRNA、miR-195 mRNA、BCL-2 mRNA 表达水平比较差异均具有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 PTEN、miR-195 和 BCL-2 mRNA 的表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	PTEN	miR-195	BCL-2 mRNA
初发组	40	4.25±1.11	1.07±0.23	9.08±2.08
缓解组	12	10.53±2.63	3.85±1.14	3.68±1.03
复发组	8	2.91±0.77	0.96±0.21	9.40±2.56
对照组	60	10.76±2.62	3.93±0.88	3.24±0.76
F 值		94.541	147.004	145.319
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

2.2 PTEN 水平的 LSD-t 多重比较 初发组及复发组患者骨髓单个核细胞中 miR-195 mRNA 表达量低于对照组和缓解组患者,差异均有统计学意义($P<0.05$),而缓解组患者的 PTEN 水平低于对照组,复发组低于初发组,但差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表2 PTEN水平的LSD-t多重比较

因变量	(I) 组别	(J) 组别	平均差 (I - J)	标准误	显著性	95% 置信区间	
						下限	上限
PTEN	初发组	缓解组	-6.275 00 ^a	0.705 30	<0.05	-7.671 9	-4.878 1
		复发组	1.337 50	0.829 93	0.110	-0.306 3	2.981 3
		对照组	-6.508 33 ^a	0.437 41	<0.05	-7.374 7	-5.642 0
	缓解组	初发组	6.275 00 ^a	0.705 30	<0.05	4.878 1	7.671 9
		复发组	7.612 50 ^a	0.978 08	<0.05	5.675 3	9.549 7
		对照组	-0.233 33	0.677 63	0.731	-1.575 5	1.108 8
	复发组	初发组	-1.337 50	0.829 93	0.110	-2.981 3	0.306 3
		缓解组	-7.612 50 ^a	0.978 08	<0.05	-9.549 7	-5.675 3
		对照组	-7.845 83 ^a	0.806 55	<0.05	-9.443 3	-6.248 4
	对照组	初发组	6.508 33 ^a	0.437 41	<0.05	5.642 0	7.374 7
		缓解组	0.233 33	0.677 63	0.731	-1.108 8	1.575 5
		复发组	7.845 83 ^a	0.806 55	<0.05	6.248 4	9.443 3

注:^a均值差的显著性水平为 0.05。

2.3 miR-195 水平的LSD-t多重比较 初发组和复发组患者骨髓单个核细胞中miR-195 mRNA表达水平低于对照组及缓解组患者,差异均有统计学意义($P<0.05$),而缓解组患者的miR-195水平低于对照组,复发组低于初发组,但差异均无统计学意义($P>0.05$),见表3。

2.4 BCL-2 mRNA水平的LSD-t多重比较 初发组及复发组患者骨髓单个核细胞BCL-2 mRNA表达水平高于正对照组及缓解组患者,差异均有统计学意义($P<0.05$),而缓解组患者的BCL-2 mRNA水平高于对照组,复发组高于初发组,但差异均无统计学意义($P>0.05$),见表4。

表3 miR-195水平的LSD-t多重比较

因变量	(I) 组别	(J) 组别	平均差 (I - J)	标准误	显著性	95% 置信区间	
						下限	上限
miR-195	初发组	缓解组	-2.780 00 ^a	0.241 01	<0.05	-3.257 4	-2.302 6
		复发组	0.107 50	0.283 60	0.705	-0.454 2	0.669 2
		对照组	-2.860 00 ^a	0.149 47	<0.05	-3.156 0	-2.564 0
	缓解组	初发组	2.780 00 ^a	0.241 01	<0.05	2.302 6	3.257 4
		复发组	2.887 50 ^a	0.334 23	<0.05	2.225 5	3.549 5
		对照组	-0.080 00	0.231 56	0.730	-0.538 6	0.378 6
	复发组	初发组	-0.107 50	0.283 60	0.705	-0.669 2	0.454 2
		缓解组	-2.887 50 ^a	0.334 23	<0.05	-3.549 5	-2.225 5
		对照组	-2.967 50 ^a	0.275 61	<0.05	-3.513 4	-2.421 6
	对照组	初发组	2.860 00 ^a	0.149 47	<0.05	2.564 0	3.156 0
		缓解组	0.080 00	0.231 56	0.730	-0.378 6	0.538 6
		复发组	2.967 50 ^a	0.275 61	<0.05	2.421 6	3.513 4

注:^a均值差的显著性水平为 0.05。

表4 BCL-2 mRNA水平的LSD-t多重比较

因变量	(I) 组别	(J) 组别	平均差 (I - J)	标准误	显著性	95% 置信区间	
						下限	上限
BCL-2 mRNA	初发组	缓解组	5.394 17 ^a	0.492 92	<0.05	4.417 9	6.370 5
		复发组	-0.322 50	0.580 02	0.579	-1.471 3	0.826 3
		对照组	5.839 17 ^a	0.305 70	<0.05	5.233 7	6.444 6
	缓解组	初发组	-5.394 17 ^a	0.492 92	<0.05	-6.370 5	-4.417 9
		复发组	-5.716 67 ^a	0.683 56	<0.05	-7.070 5	-4.362 8
		对照组	0.445 00	0.473 59	0.349	-0.493 0	1.383 0
	复发组	初发组	0.322 50	0.580 02	0.579	-0.826 3	1.471 3
		缓解组	5.716 67 ^a	0.683 56	<0.05	4.362 8	7.070 5
		对照组	6.161 67 ^a	0.563 68	<0.05	5.045 2	7.278 1
	对照组	初发组	-5.839 17 ^a	0.305 70	<0.05	-6.444 6	-5.233 7
		缓解组	-0.445 00	0.473 59	0.349	-1.383 0	0.493 0
		复发组	-6.161 67 ^a	0.563 68	<0.05	-7.278 1	-5.045 2

注:^a均值差的显著性水平为 0.05。

2.5 PTEN、miR-195、BCL-2 的表达与 AML 的关系 Spearman 相关性分析结果显示,PTEN、miR-195 的表达与 AML 呈负相关,而 BCL-2 mRNA 的表达与 AML 呈正相关,见表 5。

表 5 PTEN、miR-195、BCL-2 的表达与 AML 的关系

变量	AML	
	r 值	P 值
PTEN	-0.694	<0.05
miR-195	-0.735	<0.05
BCL-2 mRNA	0.747	<0.05

3 讨论

白血病是死亡率最高的恶性肿瘤之一,90%以上为急性白血病。AML 是较为常见的白血病种类之一^[6]。AML 的治疗手段主要为化疗,但效果不佳,且其毒副作用影响患者预后。近年来,AML 的治愈率有所提高,但其易复发,故寻找特异性的分子标志物,针对不同类型的 AML 患者给予对症治疗,对降低其复发率而言尤为重要^[7]。

PTEN 为首个被发现的磷脂酶抑癌基因,是除 p53 之外和肿瘤发生发展高度相关的基因^[8]。PTEN 可调控细胞增殖、周期及凋亡。此外,PTEN 还可调控细胞的黏附。张国君等^[9]研究表明,PTEN 在大部分实体肿瘤中表达量极少甚至缺失,在血液肿瘤中表达量也较低。BCL-2 是源于滤泡性 B 淋巴瘤的一类诱癌基因,其可促进细胞增殖。研究表明,BCL-2 在大部分实体肿瘤中表达量高,且与患者性别、年龄以及白细胞数量无关。陈颖等^[10]研究证明 AML 患者血清中的 BCL-2 含量高于正常成年人,且 BCL-2 含量直接影响患者的生存周期。miR-195 是一类抑癌基因,其在多种实体肿瘤中的表达量明显下降,但在血液系统肿瘤中的表达的报道较少,尤其是在 AML 中相对匮乏^[11-12]。

本研究 RT-PCR 检测结果表明,初治患者 PTEN mRNA 表达量低于正常成年人,提示 PTEN 抑制 AML 的发生。初治患者和复发患者 PTEN mRNA 表达量低于缓解患者,提示 PTEN 表达量升高,疗效显著。复发患者 PTEN mRNA 表达量低于正常成年人,提示 PTEN 表达量降低预示有复发的可能。初治患者 miR-195 mRNA 表达量低于正常成年人,提示 miR-195 抑制 AML 的发生。初治患者和复发患者 miR-195 mRNA 表达量低于缓解患者,提示 miR-195 表达量升高,疗效显著。复发患者 miR-195 mRNA 表达量低于正常成年人,提示 miR-195 表达量降低预示有复发的可能。初治组 BCL-2 mRNA 表达量高于正常成年人,提示 BCL-2 诱发 AML。缓解患者的

BCL-2 mRNA 表达量低于初治患者,复发患者的 BCL-2 mRNA 表达量低于缓解患者,提示 BCL-2 高表达,疗效不佳,极有可能复发。复发患者的 BCL-2 mRNA 表达量高于正常成年人,究其原因可能为治疗后白细胞水平居高不下,产生耐药性。BCL-2 在初发 AML 中表达量高,缓解治疗后,表达量下降,复发时,表达量又升高,提示 BCL-2 的表达可作为 AML 发生的预测及疗效的指标。

综上所述,PTEN、miR-195 在 AML 中表达量低,而 BCL-2 在 AML 中表达量高,三者的表达均可作为 AML 的发生、发展的预测指标,且 PTEN、miR-195 表达的与 AML 呈负相关,而 BCL-2 的表达与 AML 呈正相关,表明靶向调控 PTEN、miR-195,从而抑制 BCL-2 表达,可作为新的 AML 基因治疗靶点。

参考文献

- [1] ZAYED RA, ELTAWHEEL MA, BOTROS SK, et al. MN1 and PTEN gene expression in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Biomark*, 2017, 18(2): 177-182.
- [2] KULSOOM B, SHAMSI TS, AFSAR NA, et al. Bax, Bcl-2, and Bax/Bcl-2 as prognostic markers in acute myeloid leukemia: are we ready for Bcl-2-directed therapy? [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10(7): 403-416.
- [3] HARTMANN JU, BRÄUERHARTMANN D, KARDOSOVA M, et al. MicroRNA-143 targets ERK5 in granulopoiesis and predicts outcome of patients with acute myeloid leukemia [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(8): 814.
- [4] ZHU J, YE Q, CHANG L, et al. Upregulation of miR-195 enhances the radiosensitivity of breast cancer cells through the inhibition of BCL-2 [J]. *Int J Pharm*, 2017, 523(1): 300-309.
- [5] 孙巨勇, 牟娜, 牟佳, 等. PTEN 及 BCL-2 在急性髓系白血病中的表达及意义[J]. *中国实验血液学杂志*, 2018, 26(1): 121-125.
- [6] 张素琴, 王春美, 刘玉峰, 等. 急性淋巴细胞白血病患者骨髓白血病细胞中 microRNA-195 及 Bcl-2 mRNA 表达的意义[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2017, 32(15): 1170-1173.
- [7] 赵雪飞, 王洪岩, 赵旭, 等. 急性淋巴细胞白血病的免疫分型和基因的研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2018, 26(4): 947-952.
- [8] 郑转珍, 李国霞, 张耀方, 等. 急性白血病患者骨髓单个核细胞 CREB、Bcl-2 的表达及其与病灶髓外浸润和预后的关系[J]. *山东医药*, 2017, 57(35): 75-77.
- [9] 张国君, 刘卓刚. microRNA-103b 在急性淋巴细胞白血病患者中的表达及意义[J]. *河北医药*, 2016, 38(9): 1289-1291.
- [10] 陈颖, 李空飞, 叶佩佩, 等. miR-186 在急性髓系白血病中的表达及其临床意义[J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(21): 3041-3044, 3048.
- [11] 王晓雪, 富威, 梁颖, 等. miR-148b 在急性髓系白血病患者及细胞系中的表达与生物学功能[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(3): 340-344.
- [12] 任殷霞, 张洪波, 张翔, 等. 急性淋巴细胞白血病中 PTEN 及 Survivin 的表达及意义[J]. *中国实验血液学杂志*, 2018, 26(4): 953-957.

(收稿日期:2019-04-10)