

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.11.017

急性髓系白血病患者 HtrA2 基因、Set 基因表达与疗效和预后的关系研究*

及月茹 陈 怡 李国辉 严学倩 刘 利 秦炜炜[△]

(空军军医大学第二附属医院血液内科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探讨急性髓系白血病(AML)患者 HtrA2 基因、Set 基因表达与疗效和预后的关系。**方法:**选择 2017 年 6 月~2019 年 6 月来我院进行治疗的 90 例病历资料完整的初诊为 AML 患者作为本次研究对象,作为 AML 组,另选取同时期来我院进行健康体检的 90 例志愿者作为对照组。检测 HtrA2 基因、Set 基因在两组受试者外周血中的表达;分析 HtrA2 基因、Set 基因的表达与 AML 患者年龄、性别、白细胞计数、NCCN 预后分型和疗效的关系。**结果:**HtrA2 基因在 AML 组中表达水平低于对照组,Set 基因在 AML 组中表达水平高于对照组($P<0.05$)。HtrA2 基因的表达和年龄、性别、白细胞计数无关($P>0.05$);Set 基因的表达和年龄、性别无关($P>0.05$),与白细胞计数有关($P<0.05$)。HtrA2 基因在 NCCN 不同的预后分组中的表达差异无统计学意义($P>0.05$);Set 基因在 NCCN 不同的预后分组中的表达差异有统计学意义($P<0.05$)。HtrA2 基因和 Set 基因在不同疗效患者中的表达差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**AML 患者 HtrA2 基因表达下降,Set 基因表达升高,Set 基因和 HtrA2 基因具有评估 AML 疗效的潜力,Set 基因可辅助评估 AML 患者的预后。

关键词:急性髓系白血病;HtrA2 基因;Set 基因;疗效;预后

中图分类号:R733.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)11-2077-04

Study on the Relationship between the Expression of HtrA2 Gene and Set Gene and the Efficacy and Prognosis of Patients with Acute Myeloid Leukemia*

JI Yue-ru, CHEN Yi, LI Guo-hui, YAN Xue-qian, LIU Li, QIN Wei-wei[△]

(Department of Hematology, Second Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between the expression of HtrA2 gene and Set gene in patients with acute myeloid leukemia (AML) and the efficacy and prognosis. **Methods:** The clinical data 90 newly diagnosed patients with AML complete medical records treated in our hospital from June 2017 to June 2019 were selected as the subjects of this study, taken as AMI group. 90 healthy volunteers in our hospital were taken as the control group at the same time. The expression of HtrA2 gene and Set gene in peripheral blood of the two groups were detected. The relationship between the expression of HtrA2 gene and Set gene and age, gender, white blood cell count, prognosis classification of NCCN and efficacy. **Results:** The expression level of HtrA2 gene in AML group was lower than that in control group, while the expression level of set gene in AML group was higher than that in control group ($P<0.05$). There were no significant correlation between the expression of HtrA2 gene and age, gender, and white blood cell count ($P>0.05$); There were no significant correlation between the expression of Set gene and age, gender ($P>0.05$), while it was related to white blood cell count ($P<0.05$). There was no significant difference in expression of HtrA2 gene in different prognostic groups of NCCN ($P>0.05$). The expression of Set gene in different prognostic groups of NCCN was significantly different ($P<0.05$). There were significant difference in the expression of HtrA2 gene and Set gene in patients with different efficacy ($P<0.05$). **Conclusion:** In patients with AML, HtrA2 gene expression is decreased, and Set gene expression is increased. Set gene and HtrA2 gene have the potential to evaluate the curative effect of AML. Set gene can help to evaluate the prognosis of AML patients.

Key words: Acute myeloid leukemia; HtrA2 gene; Set gene; Efficacy; Prognosis

Chinese Library Classification(CLC): R733.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)11-2077-04

前言

急性髓系白血病(Acute myeloid leukemia, AML)是髓系造血干细胞恶性疾病,机体主要表现为骨髓和外周血中原始和幼

* 基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2017JQ8028);陕西省重点研发计划项目(2019SF-080)

作者简介:及月茹(1983-),女,博士,主治医师,研究方向:白血病, E-mail: cxtcft20@163.com

[△] 通讯作者:秦炜炜(1980-),女,博士,副主任医师,研究方向:白血病免疫治疗, E-mail: vivianq1126@126.com

(收稿日期:2020-10-13 接受日期:2020-11-08)

髓性细胞异常增生为主要特征,患者的临床表现以贫血、出血、感染和发热、脏器浸润、代谢异常为主,往往病情急,预后差,临床需积极治疗,以挽救患者的生命^[1-3]。现阶段的研究认为,白血病的发病与地域环境因素、电离辐射、化学接触、病毒感染等有关^[4,5]。最新研究认为,该病症与基因突变也有一定的联系,细胞凋亡受阻在恶性肿瘤的发生发展中有着重要作用,HtrA2 基因是参与细胞凋亡下游反应的基因之一,当细胞受到凋亡刺激时,该基因可经过一系列的参与细胞凋亡^[6,7]。Set 基因是由 2936 个碱基组成的,位于人类染色体 9q34 着丝粒的 c-abl 附近,其主要包含 2 个转录产物,已有研究认为,Set 基因能够通过抑制肿瘤转移抑制基因相关酶活性,阻止细胞凋亡,还能抑制 PP2A 活性,抑制自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)功能^[8-10]。本研究主要分析了 AML 患者 HtrA2 基因、Set 基因表达与疗效和预后的关系,以期对 AML 患者临床治疗方面提供依据。报道如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择我院 2017 年 6 月~2019 年 6 月收治的 90 例病历资料完整的初诊为 AML 患者作为本次研究对象,作为 AML 组。纳入标准:(1)诊断标准:均符合成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2017 年版)^[11]中有关规定,并经细胞形态学、免疫学、细胞遗传学、分子生物学确诊;(2)签署知情同意协议书;(3)年龄≥ 18 岁;(4)患者均为非急性早幼粒细胞白血病;患者诊断标准符合如下:患者存在贫血、发热、出血情况;患者伴有胸骨下段局部压痛、骨关节疼痛情况;患者存在粒细胞肉瘤,累及骨膜;骨髓象方面,患者骨髓增生明显;血液生化改变明显,患者的血清尿酸浓度增加;脑脊液检查显示患者的脑脊液压力升高,白细胞明显增加,蛋白质增多,涂片中可以找到白血病细胞^[9]。排除标准:(1)肝肾功能障碍者;(2)心功能不全者;(3)精神病史者;(4)认知功能障碍者;(5)难以配合完成本研究者;(6)其他原因引起的白细胞异常。AML 组中,男性 48 例,女性 42 例,年龄为 19~69 岁,平均年龄为(43.15±6.88)岁。选取同时期来我院进行健康体检的志愿者作为对照组,共 90 例,其中男性 51 例,女性 39 例,年龄为 22~68 岁,平均年龄为(45.12±7.34)岁。两组受试者的性别、年龄比较无统计学差异($P>0.05$),具有可比性。我院伦理委员会已批准本研究。

1.2 主要仪器与主要试剂

TC1000-G 实时 PCR 扩增仪,上海朗裴实业有限公司;TG16KR 台式高速冷冻离心机,上海继谱电子科技有限公司;DYCZ-40G 型转印电泳仪,上海向帆仪器有限公司;紫外分光光度计α1860,上海谱元仪器有限公司;cDNA 合成试剂盒。

1.3 RNA 提取、逆转录合成 cDNA

采取 TRIzol 一步法提取总 RNA,紫外分光光度计测定浓度及纯度,-80℃ 储存备用。取所有被研究者的标本外周抗凝血各 2 mL,分离单个核心,提取总 RNA。采取逆转录反应合成 cDNA,-20℃ 储存备用。

1.4 实时荧光定量 PCR 测定 HtrA2 基因、Set 基因表达水平

采取 Premier5.0 软件设计引物。相对定量分析 HtrA2 基因、Set 基因的 mRNA 水平。引物序列如下:HtrA2 上游引物:5'-CCGGCATTGTTAGCTCTGCTC-3';下游引物:5'-ACCTTCATGGTGTTCCTCAATC-3'。Set 上游引物:5'-AACGGATTGGTTCGATTGGG-3';下游引物:5'-TGGAAGATGGTGATGGGATTTC-3'。

实时荧光定量 PCR 测定的具体温度和循环参数:20 μL 反应体系,包括 2×SYBR 10 μL、ROX II 0.4 μL,上游引物和下游引物各 0.4 μL,cDNA 2 μL,同时加双蒸水 6.8 μL。循环参数:95℃ 预变性 30s,然后进行 95℃ 5s,60℃ 34s,做 45 个循环。

1.5 判定标准

NCCN:分为预后良好(inv(16)、t(16;16)、t(8;21)、t(15;17)),中等(正常核型,单独 +8,t(9;11)及其他指标正常),差(复杂核型(≥ 3 种克隆性染色体异常,单核核型,-5/5q-、-7/7q-,非 t(9;11)的 11q23 异常,inv(3)、t(3;3)、t(6;9)、t(9;22))。疗效判定标准:完全缓解:中性粒细胞计数≥ 1.5×10⁹/L,血小板计数≥ 100×10⁹/L,骨髓原始细胞比例 <5%^[12]。

1.6 统计学分析

本研究中所有数据资料均使用 SPSS24.0 统计软件进行处理,计量数据表示为($\bar{x} \pm s$),组内组间比较采取 t 检验,多组间比较采取 F 检验,计数资料以百分比表示,行 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HtrA2 基因、Set 基因在 AML 组和对照组的表达

HtrA2 基因在 AML 组中表达水平低于对照组,Set 基因在 AML 组中表达水平高于对照组($P<0.05$)。如表 1 所示。

表 1 HtrA2 基因、Set 基因在 AML 组和对照组的表达($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Expression of HtrA2 gene and Set gene in AML group and control group($\bar{x} \pm s$)

Groups	HtrA2	Set
Group AML(n=90)	0.208±0.102	0.643±0.123
Control group(n=90)	0.641±0.104	0.138±0.011
t	28.199	39.795
P	0.000	0.000

2.2 HtrA2 基因、Set 基因的表达和年龄、性别、白细胞计数的关系

HtrA2 基因的表达和年龄、性别、白细胞计数无关($P>0.05$),Set 基因的表达和年龄、性别无关($P>0.05$),与白细胞计数

有关($P<0.05$)。如表 2 所示。

2.3 HtrA2 基因、Set 基因的表达和 NCCN 预后分型的关系

HtrA2 基因在 NCCN 不同的预后分组中,表达无明显差异

($P>0.05$); Set 基因在 NCCN 不同的预后分组中, 表达有明显差异($P<0.05$)。如表 3 所示。

HtrA2 基因、Set 基因在不同疗效患者中的表达相比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。如表 4 所示。

2.4 HtrA2 基因、Set 基因的表达和疗效的关系

表 2 HtrA2 基因、Set 基因的表达和年龄、性别、白细胞计数的关系($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Relationship between expression of HtrA2 gene and Set gene and age, sex and white blood cell count($\bar{x}\pm s$)

Factors	n	HtrA2	t	P	Set	t	P	
Gender	Male	48	0.216±0.064	1.195	0.235	0.642±0.116	0.073	0.942
	Female	42	0.199±0.071			0.644±0.122		
Age	<60 years old	80	0.211±0.049	1.561	0.122	0.640±0.045	1.750	0.084
	≥ 60 years old	10	0.185±0.055			0.667±0.054		
White blood cell count	≥ 30×10 ⁹ /L	25	0.195±0.041	1.154	0.252	0.672±0.068	2.760	0.007
	<30×10 ⁹ /L	65	0.209±0.055			0.632±0.059		

表 3 HtrA2 基因、Set 基因的表达和 NCCN 预后分型的关系($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Relationship between expression of HtrA2 gene and Set gene and prognosis classification of NCCN($\bar{x}\pm s$)

Prognosis classification of NCCN	HtrA2	Set
Favorable prognosis(n=10)	0.217±0.054	0.574±0.018*#
Moderate prognosis(n=70)	0.212±0.066	0.644±0.051*
Poor prognosis(n=10)	0.169±0.051	0.703±0.042
F	2.128	18.359
P	0.125	0.000

Note: Compared with poor prognosis, * $P<0.05$; Compared with moderate prognosis, # $P<0.05$.

表 4 HtrA2 基因、Set 基因的表达和疗效的关系($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Relationship between the expression of HtrA2 gene and Set gene and efficacy($\bar{x}\pm s$)

Efficacy	HtrA2	Set
Complete remission(n=80)	0.217±0.026	0.637±0.037
Complete remission was not achieved(n=10)	0.137±0.029	0.689±0.042
t	8.501	4.130
P	0.000	0.000

3 讨论

AML 是一种造血系统恶性肿瘤疾病, 有着独特的细胞遗传学、免疫表型和细胞形态学, 现阶段, 临床主要通过放疗和化疗治疗^[13-15]。然而, 多数患者会在治疗缓解后, 又发生复发情况, 最终发展为难治性白血病, 危及生命。现阶段研究证实, 细胞凋亡在肿瘤的发生、发展中, 有着十分重要的作用^[16]。促凋亡基因 HtrA2 基因是一种核编码的线粒体促凋亡因子, 在线粒体膜间隙定位^[17]。关于 HtrA2 基因的促凋亡机制, 在肿瘤疾病的发生发展中, 有着十分重要的作用, 关于其和白血病之间的联系, 相关研究较少。细胞凋亡是基因控制的一种主动死亡方式, 在调控机体发育、维持机体内环境稳定方面, 有着重要作用^[18]。白血病患者, 其因异常的克隆细胞大量增殖, 而机体中的凋亡细胞下降, 使得白血病细胞在骨髓中大量增生和积聚, 骨髓的正常造血功能受到抑制^[19,20]。通过细胞凋亡, 使得白血病发生率增加。针对已经产生白血病的细胞, 理论研究认为, 如果能够重新启动受到抑制的凋亡程序, 可以实现对白血病患者的治疗^[21]。

也正因为如此, 诱导细胞凋亡, 已经成为治疗白血病的新方向。

已有研究认为, HtrA2 基因在乳腺癌、胃癌中的表达, 比正常组织明显下降^[22,23]。对于消化系统疾病、泌尿系统等患者进行研究发现, 低表达 HtrA2 基因的患者, 在治疗后, 更容易复发, 生存时间也相对较短^[24]。Set 基因位于人类染色体 9q34 着丝粒的 c-abl 附近, 包括 2 个转录产物, Set 基因能够通过抑制肿瘤转移抑制基因的 DNA 酶活性, 使得原癌基因磷酸化, 激活 APK 信号, 从而阻止细胞凋亡, 另外, 其还能抑制 PP2A 活性, 抑制自然杀伤细胞中的 γ -干扰素的生成, 抑制 NK 细胞的功能^[25,26]。Set 基因转录的完整 cDNA 在很多组织中均有表达。和正常组织对比, Set 基因可能在肿瘤中过表达, 甚至还和肿瘤分期有关, 一些体外研究认为, Set 基因的表达和急性白血病有一定的相关性^[27]。Set 基因是细胞生长发育的重要调控基因, 在血液系统肿瘤中表达, 机体之所以发生肿瘤, 是因为细胞增殖和细胞凋亡之间的平衡被打破, 骨髓中原始细胞过度增殖或凋亡减少, 使得机体发生 AML^[28]。本研究结果显示 HtrA2 基因在 AML 组中表达水平低于对照组, Set 基因在 AML 组中表达水

平高于对照组,说明 HtrA2 基因和 Set 基因在 AML 患者外周血中均存在异常表达,此外本研究结果还显示 HtrA2 基因的表达在不同年龄、性别、白细胞计数的 AML 患者中无明显差异,且 HtrA2 基因在 NCCN 不同的预后分组中,表达无明显差异,说明外周血 HtrA2 基因的表达水平并不能很好地反映 AML 患者的预后,其表达与 AML 性别、年龄及白细胞计数均无关,但仍不难发现在女性、年龄 ≥ 60 岁、白细胞计数较高的患者中 HtrA2 基因表达水平较低,这可能是因为 HtrA2 基因确实与上述指标没有必然联系,也可能因为选取的样本量有限,因此尚未发现 HtrA2 基因与上述指标的联系,因此今后将扩大样本量以获取更加精准的数据结果以验证这一猜测。Set 基因在不同白细胞计数、NCCN 不同的预后分组中表达有明显差异,说明 Set 基因与 AML 预后和白细胞计数有关,这可能为今后辅助评估 AML 患者预后提供一定的帮助。最后,本研究发现 HtrA2 基因、Set 基因在不同疗效患者中,二者的表达均有统计学意义,这表明 HtrA2 基因、Set 基因或可作为辅助评估 AML 疗效的指标,但由于研究时间有限,二者对疗效及预后的预测效能如何尚待进一步探讨。

综上所述,与正常人群相比,AML 患者外周血中 HtrA2 基因表达下降,Set 基因表达升高,Set 基因表达与患者的预后有关,HtrA2 基因、Set 基因具有辅助判断疗效的潜能,二者或可作为评估 AML 患者预后及疗效的辅助指标。

参考文献(References)

- [1] Kasner MT. Outpatient administration of liposomal daunorubicin and cytarabine (Vyxeos) in patients with secondary acute myeloid leukemia[J]. Clin Adv Hematol Oncol, 2019, 17(11): 604-606
- [2] DiNardo C, Lachowicz C. Acute Myeloid Leukemia: from Mutation Profiling to Treatment Decisions [J]. Curr Hematol Malig Rep, 2019, 14(5): 386-394
- [3] Hemsing AL, Hovland R, Tsykunova G, et al. Trisomy 8 in acute myeloid leukemia[J]. Expert Rev Hematol, 2019, 12(11): 947-958
- [4] Huang H, Wenbing Y, Dong A, et al. Chidamide Enhances the Cytotoxicity of Cytarabine and Sorafenib in Acute Myeloid Leukemia Cells by Modulating H3K9me3 and Autophagy Levels [J]. Front Oncol, 2019, 3(9): 1276
- [5] Kwaan HC, Weiss I, Tallman MS. The Role of Abnormal Hemostasis and Fibrinolysis in Morbidity and Mortality of Acute Promyelocytic Leukemia[J]. Semin Thromb Hemost, 2019, 45(6): 612-621
- [6] 李立恒, 王蕊, 王芹, 等. Omi/HtrA2 在腺样囊性癌的表达及其临床意义[J]. 实用癌症杂志, 2017, 32(5): 738-741
- [7] Napolitano F, Terracciano C, Bruno G, et al. Intrafamilial "DOA-plus" phenotype variability related to different Omi/HTRA2 expression[J]. Am J Med Genet A, 2020, 182(1): 176-182
- [8] 张婷婷, 许波群. SET 基因在肿瘤发生发展中作用机制的研究进展 [J]. 医学综述, 2019, 25(11): 2097-2102
- [9] Han H, Lee S, Lee I. NGSEA: Network-Based Gene Set Enrichment Analysis for Interpreting Gene Expression Phenotypes with Functional Gene Sets[J]. Mol Cells, 2019, 42(8): 579-588
- [10] 刘洋, 雷婷, 时瑛, 等. 急性髓系白血病患者骨髓中 Set 基因表达与预后的关系[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(9): 682-687
- [11] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2017年版)[J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(3): 177-182
- [12] Strickland, Stephen A, Shaver, et al. Genotypic and clinical heterogeneity within NCCN favorable-risk acute myeloid leukemia [J]. Leuk Res, 2018, 65(2): 67-73
- [13] 张娜, 贾永前, 青胜兰, 等. 地西他滨联合 CAG 方案对急性髓系白血病患者血清 IFN- γ , HBDH 与 LDH 水平的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(25): 4963-4966
- [14] Xiao W, Petrova-Drus K, Roshal M. Optimal Measurable Residual Disease Testing for Acute Myeloid Leukemia [J]. Surg Pathol Clin, 2019, 12(3): 671-686
- [15] Allegra A, Spatari G, Mattioli S, et al. Formaldehyde Exposure and Acute Myeloid Leukemia: A Review of the Literature [J]. Medicina (Kaunas), 2019, 55(10): 638
- [16] 王彩霞, 周志衡, 沈欢瑜, 等. 长链非编码 RNA 对急性髓系白血病细胞增殖和凋亡调控研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25(3): 159-164
- [17] 陈春暖, 陈祥荣, 蔡乾昆, 等. HTRA2 基因 G1195A 变异与华中地区帕金森病的相关性研究 [J]. 临床神经病学杂志, 2019, 32(4): 299-301
- [18] Xiong J, Kuang X, Lu T, et al. Fenretinide-induced Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Cells via NR4A1 Translocation into Mitochondria and Bcl-2 Transformation [J]. J Cancer, 2019, 10(27): 6767-6778
- [19] 柴晓阳, 朱元深, 高晓宁. 索拉非尼对 FMS 样酪氨酸激酶 3- 基因内部串联重复突变急性髓系白血病患者疗效观察[J]. 解放军医学院学报, 2019, 41(1): 1-5
- [20] Menendez-Gonzalez JB, Vukovic M, Abdelfattah A, et al. Gata2 as a Crucial Regulator of Stem Cells in Adult Hematopoiesis and Acute Myeloid Leukemia[J]. Stem Cell Reports, 2019, 13(2): 291-306
- [21] 宁红梅, 王军, 苏永锋, 等. 初诊急性髓系白血病患者来源的骨髓间充质干细胞通过调节 Caspase-3/survivin 抑制 DNR 诱导的 HL-60 细胞凋亡[J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27(6): 1736-1743
- [22] 刘聪, 周晟, 阮秋蓉. 线粒体促凋亡因子 Omi/HtrA2 在乳腺癌中的表达及意义 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2005, 14(4): 434-438
- [23] 陈泓磊, 陈创奇, 马晋平, 等. 胃癌组织中 Omi/HtrA2 的表达及与预后的关系[J]. 中华胃肠外科杂志, 2010, 13(10): 766-769
- [24] 王楠, 熊连军, 马晓露. 促凋亡基因 HtrA2 在急性髓系白血病中的表达及临床意义[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(3): 466-470
- [25] 艾桂娟, 赵丽莉, 张藏, 等. 子宫内膜癌组织 set 基因与 MACC1 表达及意义[J]. 齐鲁医学杂志, 2016, 31(3): 304-306
- [26] Cucchi DGJ, Bachas C, van den Heuvel-Eibrink MM, et al. Harnessing Gene Expression Profiles for the Identification of Ex Vivo Drug Response Genes in Pediatric Acute Myeloid Leukemia [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(5): 1247
- [27] 王娜, 张梅, 贺鹏程, 等. 沉默 SET 基因对急性早幼粒白血病 NB4-R1 细胞的作用[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(1): 41-45
- [28] 董磊, 蒋琴, 张春乐, 等. set 基因在人结肠直肠癌中表达的研究[J]. 实用肿瘤杂志, 2012, 27(04): 353-357