

慢性粒细胞白血病急变基因机制的研究进展*

王 林¹, 费 婷¹, 冯文莉^{2△}(1. 湖南医药学院检验医学院, 湖南怀化 418000; 2. 重庆医科大学检验医学院/临床检验
诊断学省部共建教育部重点实验室, 重庆 400016)

关键词: 慢性粒细胞白血病; 急变; 基因不稳定性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.19.038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)19-2864-03

目前, 慢性粒细胞白血病(CML)的治疗方法有传统的放、化疗, 异基因造血干细胞移植和通过分子设计合成的低分子拮抗剂甲磺酸伊马替尼为代表的直接抑制 BCR/ABL 酪氨酸激酶活性(TKI)的靶向治疗。传统的放、化疗疗效差且不良反应多, 异体造血干细胞移植供者有限及受患者年龄等条件的影响, 限制了临床开展和实施。只有伊马替尼为代表的酪氨酸激酶抑制剂在临床上具有显著的治疗效果^[1-3]。在 TKI 治疗 CML 以前, CML 患者的自然病程为: 慢性期演变成加速期大约 5 年, 加速期进展为急变期在数月或数年之间, 进入急变期后患者平均生存时间为 6 个月。少数 CML 患者可不经加速期而直接进入急变期。TKI 的使用可以阻断大多数 CML 患者的病情进展, 但是大约有 15% 的患者对 TKI 治疗不敏感而进展为急变期^[4]。如果患者伴有 +Ph, +8, i(17q) 和 +19 等基因异常, 将增加急变的可能^[5-6]。此外文献报道一部分 TKI 治疗有效的患者, 仍然向急变期进展^[7]。本文就基因组不稳定性导致慢性急变的机制综述如下。

1 CML 急变与染色体异常相关

CML 急变后改变原来的细胞学特征, 白血病细胞恶性增生、浸润和停止分化, 并且对 TKI 治疗不再敏感。目前 CML 的急变分子机制不太确定, 各种染色体的畸变和基因的突变是导致 CML 急变的主要原因。遗传学分析发现 CML 加速期和急变期有 40%~70% 的额外染色体异常, 而慢性期只有 7% 的异常^[8]。更加敏感的深度测序、比较基因组学和单核苷酸序列多态性分析都显示加速期和急变期的染色体和基因的改变远大于慢性期, 同时也证实在慢性期就已经存在的染色体改变^[9-11]。

回顾性研究对比伊马替尼治疗时代前后染色体和基因改变情况, 结果显示基因畸变是基本相同的, 主要包括染色体的增加、基因的缺失、插入和点突变等^[12-15]。在分子生物学水平除了有 BCR/ABL 外, 主要抑癌基因的 P53 的缺失、突变和转录因子 RUNX1 突变等。CML 的急性淋巴细胞较急性粒细胞更容易检出染色体畸变^[16]。CML 急变的病例检出的基因异常还包括染色体增加(+8, +19), t(3; 21) 和 t(7; 11) 生成 AML-1/EVI1 和 NUP98/HOXA9 融合的癌基因, inv(3), t(15; 17), 14q32 缺失, ICSBP 和 P53 灭活点突变, GATA-2 和 RAS 激活点突变^[16]。此外, 基因的突变除了在 CML 的急变发挥重要的作用, 还在 TKI 治疗耐药中也起到重要作用^[17-18]。

2 BCR/ABL 激酶区 TKI 耐药性突变在 CML 急变中的作用

50%~90% 的伊马替尼治疗耐药的患者在 BCR/ABL 激

酶区检测到点突变, 约 20% 的伊马替尼初治者检测到点突变的存在^[19]。伊马替尼耐药病例应用第二代 TKI 治疗导致了更强选择性的点突变^[20]。第三代 TKI 的临床试验也出现第一代和第二代 TKI 类似的激酶区的突变^[21]。总之, BCR/ABL 激酶区的突变是导致 TKI 治疗难以克服的问题。

BCR/ABL TKI 耐药性突变后, CML 细胞的激酶活性、底物的利用能力、增殖能力和集落形成能力都出现增强, 这可能导致 CML 的进展^[22-23]。例如, BCR-ABL 激酶区的 TKI 耐药性 EVI1 易位的病例, 将急变为急性粒细胞白血病^[24]。

3 CML 急变的复杂性

CML 急变期的基因改变普遍存在, 但是没有一种特定的改变在大多数急变期中出现, 也就是说没有一种基因突变在 CML 的急变中起决定作用, 更可能是多中突变相互叠加的结果。比较被人们认可的观点是 CML 的急变是多级时间依赖的复杂损伤和病理性修复的过程, 其起始是依赖或者不依赖 BCR/ABL 的病理性 DNA 损伤和不完全反复的修复, 导致新的基因损伤, 从而选择性导致了 CML 的急变^[25]。

BCR/ABL 激酶的活性和 BCR/ABL 基因突变的频率呈直接的正相关, 因此不受控的增长的 BCR/ABL 激酶活性导致了细胞克隆性的增生, 抑制了细胞的分化, 从而导致了 CML 的急变^[26]。这种效应可能发生在先天或获得性对 TKI 耐药的白血病干细胞(LSC)和白血病祖细胞(LPC)水平上, 从而导致 LPC 的恶性克隆的增生^[27]。因此, 可以推测要抑制 CML 的急变, 应该使用一种全新策略的针对于 LSC 和 LPC 的复杂分子调控网络, 恢复其正常干细胞多向分化的特性。

4 基因的不稳定性促进 CML 的急变

4.1 DNA 损伤增加 内源性的 DNA 损伤主要来自于细胞内活性氧的增多, 导致如 H₂O₂ 等的超氧化物的增加所引起。BCR/ABL 转化的细胞系和 CD34⁺ CML 细胞内的活性氧的浓度是正常细胞的 2~6 倍^[26-28]。活性氧增加导致 DNA 碱基的氧化和 DNA 双链的断裂^[29]。此外 CML 患者的造血细胞更加容易受到电离辐射和对 DNA 有损伤药物的影响, 这也使 DNA 损伤机会增加^[30]。

4.2 DNA 损伤修复的不完全和低效率 细胞的 DNA 损伤修复系统是修复损伤的 DNA 以保证细胞基因组的完整性。如果 DNA 的损伤过于严重, 细胞启动凋亡机制清除受损细

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(30871102); 湖南省教育厅科研项目(15C0991); 湖南医药学院科研项目(2015ky01)。 作者简介: 王林, 男, 讲师, 主要从事慢性粒细胞白血病治疗的研究。 △ 通讯作者: E-mail: fengwlcqmu@sina.com。

胞^[31]。而 BCR/ABL 激酶活性却抑制细胞的凋亡,从而限制了 DNA 损伤修复的彻底性^[32]。这种有缺陷和不彻底的 DNA 的氧化损伤修复导致更多的点突变和染色体畸变^[33]。

4.3 LSC 和 LPC 的基因不稳定性 造血干细胞的 t(9;22)的易位可能是随机事件,也可能是本身具有的病理改变,造血干细胞的基因不稳定导致了 t(9;22)(q34;q11),BCR/ABL 蛋白激酶活性导致 CML 的发生和发展。前文中提到的 CML 的高氧化损伤和基因毒性药物的治疗,以及异常的 DNA 损伤的修复机制,导致了 LSC 和 LPC 的基因不稳定。相关报道显示 CML 的 LSC 和 LPC 的基因不稳定是依赖于 BCR/ABL 蛋白而不是依赖 BCR/ABL 蛋白激酶活性^[34],因此,虽然在 TKI 治疗时抑制了 BCR/ABL 蛋白激酶活性^[35],但是 BCR/ABL 蛋白仍然是存在的。基因的不稳定,最先可能发生在 CD34⁺、CD38⁻ LSC 和(或)CD34⁺ LPC 细胞群。如果在慢性期 LSC 和(或)LPC 检测出 TKI 耐药突变和染色体畸变的病例^[27],则进展为急性粒细胞白血病 z 或急性淋巴细胞白血病的比例将大大增加,可见基因的不稳定性可能发生在 LSC 和(或) LSC 水平。

5 小 结

综上所述,可以推测 CML-CP 的 LSC 和(或)LPC 的高 DNA 损伤和不彻底的 DNA 损伤修复,产生的基因突变和染色体的畸变,导致了 CMLTKI 治疗的耐药和恶性的进展,TKI 耐药的 CML-CP 的 LSC 和(或)LPC 最终引起了 CML 的急变。目前还不能确定的问题有:CML 的基因不稳定性是发生在 LSC 水平还是 LPC 水平,或两者都存在;LSC 和(或)LPS 的基因不稳定性的分子机制;CML-BP 的 LSC 和 LPS 细胞克隆增生、分化障碍和基因的不稳定性是否单独依赖 BCR/ABL 等,需要在今后研究得以证实。

参考文献

- [1] Shah NP, Guilhot F, Cortes JE, et al. Long-term outcome with dasatinib after imatinib failure in chronic-phase chronic myeloid leukemia: follow-up of a phase 3 study[J]. *Blood*, 2014, 123(15): 2317-2324.
- [2] O'hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2007, 110(7): 2242-2249.
- [3] Ionova TI, Nikitina TP, Fedorenko D, et al. Long-Term outcomes of dasatinib therapy in patients with imatinib-resistant or intolerant chronic myeloid leukemia from physician's and patient's perspective[J]. *Blood*, 2014, 124(21): 2644.
- [4] Foroni L, Gerrard G, Nna E, et al. Technical aspects and clinical applications of measuring BCR-ABL1 transcripts number in chronic myeloid leukemia[J]. *Am J Hematol*, 2009, 84(8): 517-522.
- [5] Zhou H, Xu R. Leukemia stem cells: the root of chronic myeloid leukemia[J]. *Protein Cell*, 2015, 6(6): 403-412.
- [6] Luo Y, Zhang P, Lou SF, et al. Analysis of karyotype in 65 cases with chronic myeloid leukemia and its clinical significance[J]. *J Modern Onco*, 2010, 18(10): 2053-2054.
- [7] Tantiworawit A, Power MM, Barnett MJ, et al. Long-term follow-up of patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase developing sudden blast phase on imatinib therapy[J]. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53(7): 1321-1326.

- [8] Grace C, Nacheva EP. Significance analysis of microarrays (SAM) offers clues to differences between the genomes of adult Philadelphia positive ALL and the lymphoid blast transformation of CML[J]. *Cancer Inform*, 2012, 11(11): 173-183.
- [9] Grossmann V, Kohlmann A, Zenger M, et al. A deep-sequencing study of chronic myeloid leukemia patients in blast crisis (BC-CML) detects mutations in 76.9% of cases[J]. *Leukemia*, 2011, 25(3): 557-560.
- [10] Brazma D, Grace C, Howard J, et al. Genomic profile of chronic myelogenous leukemia: Imbalances associated with disease progression[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2007, 46(11): 1039-1050.
- [11] Khorashad JS, De Melo VA, Fiegler H, et al. Multiple sub-microscopic genomic lesions are a Universal feature of chronic myeloid leukaemia at diagnosis[J]. *Leukemia*, 2008, 22(9): 1806-1807.
- [12] Choi R, Jang MA, Yoo KH, et al. The first Korean case of childhood acute myeloid leukemia with inv(11)(p15q22)/NUP98-DDX10 rearrangement: a rare but recurrent genetic abnormality[J]. *Ann Lab Med*, 2014, 34(6): 478-480.
- [13] Cannella L, Loggisci G, Nanni M, et al. Trisomy 8 in Philadelphia chromosome negative cell preceding the evolution of a Philadelphia chromosome positive clone with the same additional change during imatinib treatment: revisiting the role of genetic instability in chronic myeloid leukemia[J]. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53(3): 497-498.
- [14] Roche-Lestienne C, Deluche L, Corm S, et al. RUNX1 DNA-binding mutations and RUNX1-PRDM16 cryptic fusions in BCR-ABL + leukemias are frequently associated with secondary trisomy 21 and may contribute to clonal evolution and imatinib resistance[J]. *Blood*, 2008, 111(7): 3735-3741.
- [15] Haeflrich C, Bacher U, Schnittger S, et al. Similar patterns of chromosome abnormalities in CML occur in addition to the Philadelphia chromosome with or without tyrosine kinase inhibitor treatment[J]. *Leukemia*, 2010, 24(3): 638-640.
- [16] Zhang SJ, Ma LY, Huang QH, et al. Gain-of-function mutation of GATA-2 in acute myeloid transformation of chronic myeloid leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(6): 2076-2081.
- [17] Hochhaus A, Saglio G, Larson RA, et al. Nilotinib is associated with a reduced incidence of BCR-ABL mutations vs imatinib in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase[J]. *Blood*, 2013, 121(18): 3703-3708.
- [18] Schmidt M, Rinke J, Schiffer V, et al. Molecular-defined clonal evolution in patients with chronic myeloid leukemia Independent of the BCR-ABL status[J]. *Blood*, 2014, 28(12): 2292-2299.
- [19] Soverini S, De Benedittis C, Machova Polakova K, et al. Unraveling the complexity of tyrosine kinase inhibitor-resistant populations by ultra-deep sequencing of the BCR-ABL kinase domain[J]. *Blood*, 2013, 122(9): 1634-1648.
- [20] Santos FP, Quintás-Cardama A. New drugs for chronic myelogenous leukemia[J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2011, 6(2): 96-103.
- [21] Eide CA, Adrian LT, Tyner JW, et al. The ABL Switch control inhibitor DCC-2036 is active against the chronic myeloid leukemia mutant BCR-ABL T315I and exhibits a narrow resistance profile[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(9): 3189-3195.
- [22] Lange T, Ernst T, Gruber FX, et al. The quantitative level of T315I mutated BCR-ABL predicts for major molecular response

- to second-line nilotinib or dasatinib treatment in patients with chronic myeloid leukemia[J]. Haematologica, 2013, 98(5): 714-717.
- [23] Sweet K, Zhang L, Pinilla-Ibarz J. Biomarkers for determining the prognosis in chronic myelogenous leukemia[J]. J Hematol Oncol, 2013, 6(1): 54.
- [24] Paquette RL, Nicoll J, Chalukya M, et al. Frequent EVI1 translocations in myeloid blast crisis CML that evolves through tyrosine kinase inhibitors[J]. Cancer Genet, 2011, 204(7): 392-397.
- [25] Perrotti D, Jamieson C, Goldman J, et al. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation[J]. J Clin Invest, 2010, 120(7): 2254-2264.
- [26] Cramer K, Nieborowska-Skorska M, Koptyra M, et al. BCR/ABL and other kinases from chronic myeloproliferative disorders stimulate single-strand annealing, an unfaithful DNA double-strand break repair[J]. Cancer Res, 2008, 68(17): 6884-6888.
- [27] Hughes TP, Ross DM, Melo JV. Challenges of treatment: tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myeloid leukemia [M]. New York: Springer International Publishing, 2014: 53-65.
- [28] Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Hochhaus A, et al. Anti-oxidant vitamin E prevents accumulation of imatinib-resistant BCR-ABL1 kinase mutations in CML-CP xenografts in NSG mice[J]. Leukemia, 2013, 27(11): 2253-2254.
- [29] Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, et al. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis[J]. Mutat Res, 2011, 711(1/2): 193-201.
- [30] Koptyra M, Cramer K, Slupianek A, et al. BCR/ABL promotes accumulation of chromosomal aberrations induced by oxidative and genotoxic stress[J]. Leukemia, 2008, 22(10): 1969-1972.
- [31] Chen H, Liao SB, Cheung MP, et al. Effects of sperm DNA damage on the levels of RAD51 and p53 proteins in zygotes and 2-cell embryos sired by golden hamsters without the major accessory sex glands[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 53(4): 885-892.
- [32] Gierut JJ, Mathur PS, Bie W, et al. Targeting protein tyrosine kinase 6 enhances apoptosis of colon Cancer cells following DNA damage[J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(11): 2311-2320.
- [33] Stoklosa T, Poplawski T, Koptyra M, et al. BCR/ABL inhibits mismatch repair to protect from apoptosis and induce point mutations[J]. Cancer Res, 2008, 68(8): 2576-2580.
- [34] Hamilton A, Helgason GV, Schemionek M, et al. Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival[J]. Blood, 2012, 119(6): 1501-1510.
- [35] Xiang Z, Kaur V, Aburiziq IK, et al. Natural history of chronic myelomonocytic leukemia: gene sequencing identifies multiple clonal molecular abnormalities associated with rapid progression to acute myeloid leukemia[J]. Clinical case reports, 2014, 2(6): 265-270.

(收稿日期: 2015-07-08)

• 综 述 •

时间分辨荧光免疫分析技术在医学领域的应用*

史咏梅¹, 何 晖², 冯子力¹, 谭 华¹, 伍碧梅¹, 朱 海³, 涂承宁¹, 柯明剑¹, 叶立青¹,
唐明慧¹, 杨 泽¹综述, 汪海波^{1△}审核

(1. 珠海出入境检验检疫局保健中心, 广东珠海 519020; 2. 广州市疾病预防控制中心, 广东广州 510080; 3. 深圳市易瑞生物技术有限公司, 广东深圳 518102)

关键词: 时间分辨荧光免疫分析; 稀土金属元素; 医学诊断

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 19. 039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)19-2866-04

标记免疫分析技术是在抗原与抗体特异性反应的基础上标记各种可测量的标记物, 是目前在微量检测领域独具优势的免疫分析技术。20 世纪 60 年代初期, Yallow 和 Berson 创立了放射性免疫分析方法(RIA), 因其具有极好的微量分析性能而迅速被应用于临床诊断和医学科学研究, 但因其放射性危害、试剂昂贵且保存期短等劣势被限制了进一步发展。此后酶标记免疫分析技术(EI)、化学发光免疫分析技术(CLIA)、电化学发光免疫分析技术(ECLIA)、荧光免疫分析技术(FIA)、时间分辨荧光免疫分析技术(TRFIA)等非 RIA 相继问世, 其中 TRFIA 在检测灵敏性方面超过 RIA 2~3 个数量级, 被认为是非常具有发展潜力的非放射性标记免疫分析技术。本文就 TRFIA 的研究及在医学领域的应用综述如下。

1 TRFIA 的原理及特点

1.1 TRFIA 的基本原理 TRFIA 是在 FIA 的基础上发展起

来的一种特殊的荧光分析技术, 其利用镧系元素的三价离子及其螯合物为示踪物, 标记抗体、抗原、激素、多肽、蛋白质、核酸探针及生物细胞, 待反应体系(目前常用的有抗原抗体反应、生物素亲和素反应、核酸探针杂交等)发生后, 吸收紫外光, 发出特异荧光, 待激发光杂散光及本底荧光衰变后, 用特定的分析检测仪测定反应产物中的荧光强度。通过与相对荧光强度比较, 从而判断反应体系中分析物的浓度。

1.2 TRFIA 的主要特点 镧系的某些稀土金属如铕(Eu)、铽(Tb)、钐(Sm)的三价离子与其配体形成的螯合物具有相似的独特荧光特性, 如荧光寿命长、激发光和发射光的波长差(stokes 位移)大、激发光谱和发射光谱无交叉、特征峰非常尖锐等特点。通过有效利用波长分辨和时间分辨技术排除非特异荧光, 实现了高信噪比和灵敏度, 以时间分辨技术测量特异荧光, 对待检物质进行定量分析。解决了普通荧光分析中材料

* 基金项目: 国家质检总局科技项目(2013IK248); 广东省科技厅项目(2013B040402001)。 作者简介: 史咏梅, 女, 主管技师, 主要从事卫生检疫试验方法研究。△ 通讯作者, E-mail: wanghb1013@hotmail. com。