

非肌型丝切蛋白基因表达水平与慢性粒细胞白血病患者预后的关系分析

王 静,袁玉军[△]

(公安县人民医院检验科,湖北荆州 434300)

摘 要:目的 分析非肌型丝切蛋白基因(CFL1)表达水平与慢性粒细胞白血病(CML)患者预后的关系。方法 收集 2011 年 2 月至 2013 年 4 月该院收治的 70 例初发 CML 患者的临床资料作为 CML 组,选择同期来该院体检的健康人群 40 例作为对照组,入院后均留取外周血标本,测定其外周单个核细胞 CFL1 表达水平的变化,比较 CML 与健康者 CFL1 表达的差异,分析 CFL1 与 CML 患者预后的关系。结果 CML 组 CFL1 表达水平明显低于对照组($t=16.435, P<0.05$);CML 患者随访 12~48 个月,平均 (37.5 ± 1.3) 个月,随访结束存活 44 例(62.86%),死亡 26 例(37.14%);死亡组的年龄 ≥ 50 岁、白细胞计数 $\geq 50\times 10^9/L$ 、血小板计数 $<100\times 10^9/L$ 或 $>700\times 10^9/L$ 、外周血原始细胞百分比 $\geq 3\%$ 、Ph 染色体阴性、骨髓原始细胞百分比 $\geq 5\%$ 所占比例均高于存活组($\chi^2=4.450, 7.446, 7.540, 5.885, 10.431, 5.053$, 均 $P<0.05$),其 CFL1 表达水平低于存活组($t=10.026, P<0.05$);Cox 回归分析显示,年龄 ≥ 50 岁、白细胞计数 $\geq 50\times 10^9/L$ 、血小板计数 $<100\times 10^9/L$ 或 $\geq 700\times 10^9/L$ 、Ph 染色体阴性、骨髓原始细胞百分比 $\geq 5\%$ 、低 CFL1 表达水平均为影响 CML 预后的相关因素(均 $P<0.05$)。结论 CML 患者骨髓 CFL1 表达水平较低,同时,年龄、白细胞计数、血小板计数、Ph 染色体、骨髓原始细胞百分比、CFL1 表达水平均与 CML 患者不良生存预后有关。

关键词:慢性粒细胞白血病; 非肌型丝切蛋白; 伊马替尼; 预后

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.05.012

中图法分类号:R733.72;Q786

文章编号:1673-4130(2019)05-0557-04

文献标识码:A

The relationship between the expression level of non-muscularized cofilin gene and the prognosis of patients with chronic myelogenous leukemia

WANG Jing, YUAN Yujun[△]

(Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Gong'an County, Jingzhou, Hubei 434300, China)

Abstract: **Objective** To analyze the relationship between the expression level of non-muscularized cofilin gene (CFL1) and the prognosis of patients with chronic myelogenous leukemia (CML). **Methods** The clinical data of 70 patients with primary CML admitted to our hospital from February 2011 to April 2013 were collected as CML group. Forty healthy people who had physical examination in our hospital during the same period were selected as control group. After admission, peripheral blood samples were taken to determine the expression level of CFL1 in peripheral mononuclear cells. The difference of CFL1 expression between CML and healthy people was compared, and the relationship between CFL1 and prognosis of CML patients was analyzed. **Results** The expression level of CFL1 in CML group was significantly lower than that in control group ($t=16.435, P<0.05$). 44 patients survived (62.86%) and 26 died (37.14%) after follow-up for 12 to 48 months, with an average of (37.5 ± 1.3) months. The proportions of age (≥ 50 years old), white blood cell count ($\geq 50\times 10^9/L$), platelet count ($<100\times 10^9/L$ or $>700\times 10^9/L$), peripheral blood primordial cell percentage ($\geq 3\%$), Ph chromosome negative and bone marrow primordial cell percentage ($\geq 5\%$) in the death group were higher than those in the survival group ($\chi^2=4.450, 7.446, 7.540, 5.885, 10.431, 5.053$, all $P<0.05$), and the expression level of CFL1 was lower than that in the survival group ($t=10.026, P<0.05$). Cox regression analysis showed that age (≥ 50 years old), white blood cell count ($\geq 50\times 10^9/L$), platelet count ($<100\times 10^9/L$ or $>700\times 10^9/L$), Ph chromosome negative, percentage of bone marrow primordial cells ($\geq 5\%$) and low expression of CFL1 were all related factors affecting the prognosis of CML (all $P<0.05$). **Conclusion** The expression level of CFL1 in bone marrow of CML patients was low. Age, white blood cell count, platelet count, Ph chromosome, percentage of bone marrow primordial cells and the expression level of CFL1 were re-

作者简介:王静,女,副主任技师,主要从事血液疾病诊断研究。 [△] 通信作者, E-mail: yuanyujunw@sina.com。

本文引用格式:王静,袁玉军.非肌型丝切蛋白基因表达水平与慢性粒细胞白血病患者预后的关系分析[J].国际检验医学杂志,2019,40(5):557-560.

lated to poor survival and prognosis of CML patients.

Key words: chronic myelogenous leukemia; non-muscularized cofilin; imatinib; prognosis

慢性粒细胞白血病(CML)系发生于造血干细胞的恶性克隆性疾病,BCR-ABL 融合基因为其发病的关键启动基因,其编码 P210 蛋白活化可激活酪氨酸激酶活性,影响下游信号通路调控,干扰纤维状肌动蛋白(F-actin)功能,降低细胞对基质反应性,影响细胞凋亡及黏附过程^[1]。在大部分非肌细胞内,F-actin 均为动态结构,其处于持续解聚过程以维持细胞形态,非肌型丝切蛋白(CFL1)则为肌动蛋白解聚因子的重要成员,其存在于真核生物体内的一类肌动蛋白结合蛋白,其可通过与肌动蛋白发生解聚促进肌动蛋白纤维能循环应用,确保肌动蛋白纤维快速聚合、解聚,影响细胞及其外基质黏附,促进细胞运动、迁移、分裂及凋亡^[2]。丝切蛋白其活性受到磷酸肌醇、肌球蛋白、去磷酸化等多因素影响,对细胞内信号转导、肌动蛋白骨架重组均存在一定程度的影响,可促进恶性肿瘤侵袭及转移^[3]。但目前 CFL1 在 CML 发病中的作用及对患者预后的影响,笔者查阅文献发现尚未见报道。基于此,为探讨 CFL1 与 CML 预后的关系,现对本院收治的 70 例初发 CML 患者的临床资料进行回顾性分析,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采用回顾性研究,收集 2011 年 2 月至 2013 年 4 月本院收治的 70 例初发 CML 患者的临床资料作为 CML 组。纳入标准:均符合血液病诊断及疗效标准中 CML 相关诊断标准^[4],且为初发患者,处于疾病缓解期;入院后均接受伊马替尼治疗;病例资料完善,有明确初诊、治疗后骨髓标本,有明确 CFL1 监测数据;临床及随访资料完整。排除标准:合并严重心、肝、肾、肺器质性功能障碍者;合并严重精神疾病者;合并其他恶性肿瘤者;其他类型白血病患者;临床及随访资料不完整者。选择同期来本院体检的 40 例健康体检者作为对照组。对照组均体检健康者,入院后均留取外周血样本,均无血液病家族史。CML 组与对照组性别、年龄、体质量等基线资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 CML 患者与健康者一般资料比较				
组别	n	性别[n(%)]		体质量 ($\bar{x}\pm s$,kg)
		男	女	
CML 组	70	42(60.00)	28(40.00)	50.14 $\pm$ 5.79
对照组	40	23(57.50)	17(42.50)	51.45 $\pm$ 6.22
χ^2/t 值		0.047		1.111
P		0.826		0.269

1.2 材料、主要试剂与仪器 标本:CML 患者及健康者标本均来源于医院血液科及体检中心。试剂:Trizol

抽提试剂、逆转录酶、Taq DNA 合成酶、缓冲液(美国天根公司),淋巴细胞分离液(上海试剂二厂),CFL1 及内参 GAPDH 引物设计及合成(上海生工生物工程公司),SYBR green(大连 Takara 公司)。仪器:冰冻高速离心机(德国 Heraeus 公司),台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司),微量 DNA 定量仪(美国 Thermo 公司),制冰机(美国 Sigma 公司),荧光分析仪(美国 Bio-Rad 公司),DNA 扩增仪(美国 PE 公司),紫外分光光度计(北京普析通用仪器公司)。

1.3 方法 所有 CML 患者均接受伊马替尼(瑞士 Novartis Pharma Schweiz AG 生产,批号 H20100263)口服治疗,400 mg/d,治疗期间均监测细胞学、血液学等指标的改善,并调整治疗剂量。治疗前 CML 患者均收集骨髓 4 mL,淋巴细胞液分离骨髓单个核细胞,健康者入院后收集外周血 4 mL,均经淋巴细胞分离液分离单个核细胞,−80 ℃低温保存,加入含 20% 胎牛血清培养基培养 24 h,制备染色体,检查染色体核型。提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,进行实时定量 PCR 反应,CFL1 引物序列,上游:GCG TAA GTC TTC AAC GCC AGA G,下游:TCG ACA GTC TGG CCC ACA TC;内参 GAPDH 引物序列,上游:ATG GGG AAG GTG AAG GTC G;下游:GGG TCA TTG ATG GCA ACA ATA TC。PCR 反应体系共 25 μ L,包括 2 $\times$ SYBR@Premix EX TaqTM II 12.5 μ L+内参基因+上下游引物 0.4 μ mol+cDNA 模板 1 μ L+焦碳酸二乙酯(DEPC)纯化水。PCR 反应条件:95 ℃预变性 3 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,40 个循环,观察荧光信号及溶解曲线,PCR 产物加入 5:16 $\times$ 缓冲液,加样 2% 琼脂糖凝胶,电泳,紫外分光光度仪下观察条带位置,进行 PCR 扩增,反应结束后,任意选择 4~5 个阳性模板进行标准梯度点分析,决定系数(r^2) >0.97 ,提示线性关系良好,确定定量标准曲线,并获取荧光定量反应绝对值为目的基因表达水平。收集所有患者人口学资料、外周血白细胞计数、嗜酸性粒细胞计数、骨髓象、Ph 染色及随访情况。

1.4 随访情况 所有患者均随访至 2017 年 4 月,研究终点:总生存(OS)表示自确诊 CML 至死亡;无事件生存(EFS)表示自确诊 CML 后出现以下事件(丧失完全遗传学反应、停药、疾病进展、任何原因所致死亡)为止;无进展生存(PFS)表示自确诊 CML 至疾病加速、急变或其他原因所引起死亡为止。同一事件多次发生则以首次发生事件为准。

1.5 统计学处理 所有数据均采用 SPSS20.0 统计软件进行处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验,配对样本行配对 t 检验;计数资料以率表示,采用 χ^2 检验;生存分析采用 Kaplan-Meier 分

析,多因素与 CML 预后分析采用 Cox 回归分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CML 患者与对照组 CFL1 表达比较 CML 组 CFL1 表达水平明显低于对照组,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 2。

表 2 CML 患者与对照组 CFL1 表达比较($\bar{x}\pm s$)		
组别	<i>n</i>	CFL1
CML 组	70	1.92±0.26
对照组	40	2.97±0.41
<i>t</i>		16.435
<i>P</i>		<0.001

2.2 疾病转归情况 70 例 CML 患者随访 12~48 个月,平均(37.5±1.3)个月,随访结束存活 44 例(62.86%),死亡 26 例(37.14%)。死亡组的年龄≥50 岁、白细胞计数≥50×10⁹/L、血小板计数<100×10⁹/L 或>700×10⁹/L、外周血原始细胞百分比≥3%、Ph 染色体阴性、骨髓原始细胞百分比≥5% 所占比例均高于存活组($P<0.05$),其 CFL1 表达水平低于存活组($P<0.05$),见表 3。

表 3 不同预后 CML 患者临床资料比较[n(%)]/($\bar{x}\pm s$)				
项目	存活组 (<i>n</i> =44)	死亡组 (<i>n</i> =26)	χ^2/t	<i>P</i>
性别				
男	26(59.09)	16(61.54)		
女	18(40.91)	10(38.46)	0.040	0.839
年龄				
≥50 岁	19(43.18)	18(69.23)		
<50 岁	25(59.82)	8(30.77)	4.450	0.034
白细胞计数				
≥50×10 ⁹ /L	23(52.27)	22(84.62)		
<50×10 ⁹ /L	21(47.73)	4(15.38)	7.446	0.006
血小板计数				
<100×10 ⁹ /L 或>700×10 ⁹ /L	19(43.18)	20(76.92)		
100~700×10 ⁹ /L	25(56.82)	6(23.08)	7.540	0.006
外周嗜酸性粒细胞百分比				
≥5%	25(56.82)	16(61.54)		
<5%	19(43.18)	10(38.46)	0.150	0.698
外周嗜碱性粒细胞百分比				
≥10%	26(59.09)	16(61.54)		
<10%	18(40.91)	10(38.46)	0.040	0.839
外周血原始细胞百分比				
≥3%	19(43.18)	19(73.08)		
<3%	25(56.82)	7(26.92)	5.885	0.015
Ph 染色体				
阳性	31(70.45)	8(30.77)		
阴性	13(29.55)	18(69.23)	10.431	0.001
骨髓原始细胞百分比				
≥5%	20(45.45)	19(73.08)		
<5%	24(54.55)	7(26.92)	5.053	0.024

续表 3 不同预后 CML 患者临床资料比较[n(%)]/($\bar{x}\pm s$)				
项目	存活组 (<i>n</i> =44)	死亡组 (<i>n</i> =26)	χ^2/t	<i>P</i>
骨髓嗜酸性粒细胞百分比				
≥5%	22(50.00)	14(53.85)		
<5%	22(50.00)	12(46.15)	0.096	0.755
骨髓嗜碱性粒细胞百分比				
≥5%	21(47.73)	15(57.69)		
<5%	23(52.27)	11(42.31)	0.649	0.420
CFL1 表达水平	2.41±0.36	1.47±0.41	10.026	<0.001

2.3 CML 患者预后 Cox 模型回归分析 Cox 回归分析显示,年龄≥50 岁、白细胞计数≥50×10⁹/L、血小板计数<100×10⁹/L 或>700×10⁹/L、Ph 染色体阴性、骨髓原始细胞百分比≥5%、低 CFL1 表达水平均不利于 CML 患者远期生存,均为影响其预后的相关因素,其中 Ph 染色体阴性危险度最高,其次为白细胞计数≥50×10⁹/L、低 CFL1 表达水平,见表 4。

表 4 CML 患者预后 Cox 模型回归分析			
因素	HR(95%CI)	SE	<i>P</i>
年龄≥50 岁	1.264(0.764~1.861)	0.146	0.036
白细胞计数≥50×10 ⁹ /L	5.614(1.954~15.564)	5.261	0.001
血小板计数<100×10 ⁹ /L 或>700×10 ⁹ /L	3.721(1.714~9.541)	3.478	0.021
外周血原始细胞百分比≥3%	0.186(0.041~0.864)	0.144	0.254
Ph 染色体阴性	5.987(2.414~18.564)	5.654	<0.001
骨髓原始细胞百分比≥5%	3.844(1.654~10.266)	3.547	0.018
低 CFL1 表达水平	4.224(1.264~13.451)	4.514	0.012

3 讨 论

CML 属多能造血干细胞克隆增生性疾病,其临床病理过程最初为慢性期,继之转变为加速期,最终急变,导致患者死亡^[5]。CML 患者常伴 Ph 染色体异常及 BCR-ABL 融合基因改变,两者在其发病及进展过程中均有其重要作用,其中 BCR-ABL 其 DH 区域、SH3 区域均可影响 RhoA/LIM/cofilin 等通路调节,影响肌动蛋白骨架重塑,对细胞黏附、迁移、增殖分化产生影响,促进 CML 发病及进展^[6]。既往常通过检测 BCR-ABL 转录水平来评定 CML 治疗反应性及预后。但研究发现,前期治疗方案、年龄、白细胞计数等因素均可能对其预测效果产生影响^[7-8]。BARRETT 等^[9]表示,白血病祖细胞与骨髓基质纤维黏连蛋白黏附改变同样是引起 CML 发病的重要机制。细胞周期调节紊乱、细胞黏附异常为 CML 另一特点,其黏附、运转及迁移过程涉及肌动蛋白骨架应力形成、整合素黏着斑信号通路、细胞外基质信号调控等过程,而 F-actin 在上述信号通路调节中有重要作用,其可通过与整合素细胞内部分相连共同参与细胞与细胞外基质信号传导过程。CFL1 则为 F-actin 关键调控蛋白,定

位于 11q13 染色体,系低相对分子质量肌动蛋白解聚因子家族成员,可识别及剪切与单体肌动蛋白,调节其聚合、解聚,并可通过影响 F-actin 表达,调节黏着斑信号,影响细胞黏附、形态变化及维持。且动物实验发现,CFL1 可调控肌动蛋白表达,影响转录因子定位,诱导细胞凋亡及周期调控^[10]。早期已被证实 CFL1 持续激活可增加结肠癌、前列腺癌细胞增殖、侵袭能力,系肿瘤细胞侵袭、转移的关节调控因子,可影响细胞运动,调动肌动蛋白骨架重组,诱导肿瘤侵袭、转移^[11-12]。何雯等^[13]研究发现,CFL1 为转化生长因子信号通路的下游分子,其可通过强化转化生长因子作用增加肿瘤细胞侵袭性,促进肿瘤进展,导致其复发、转移。

本研究发现,与健康者比较,CML 患者 CFL1 表达水平明显降低,CML 患者其外周血单个核细胞成分主要为相对成熟中晚幼粒细胞,而健康者其外周血单个核细胞均为成熟细胞^[14],考虑到 CML 患者 CFL1 水平降低可能与其参与血液系统粒细胞分化有关。而进行预后相关因素分析发现,年龄、白细胞计数、血小板计数、Ph 染色体、骨髓原始细胞百分比、CFL1 表达水平平均对 CML 患者生存预后产生影响,一般 Ph 染色体畸变常出现 CML 加速期或急变期,提示预后差,主要与染色体异常可能改变 CML 患者白血病细胞生物学特性有关。且高龄患者其机体免疫抵抗力低下,各机能处于逐渐退化过程,预后通常较差。而骨髓原始细胞百分比增加则提示细胞形态发生异常改变、粒细胞系统核浆发育不平衡,增加 CML 病变风险。白细胞及血小板计数则为 CML 患者疾病状态的重要体现,持续血小板减少,白细胞计数上调,导致其聚集于骨髓内,进一步影响 CML 患者骨髓正常造血功能,增加全身血液扩散程度,促进疾病进展,影响患者预后^[15-16]。此外,低 CFL1 表达是影响患者预后的重要因素,其表达水平的变化与 CML 患者细胞分化程度及疾病状态均有其关联,表达上调,可影响 F-actin 聚集及解聚,调节整合素黏着斑信号通路,改变细胞间黏附反应。而其表达下调,上述各因子作用减弱,F-actin 解聚功能遭到抑制,暴露肌动蛋白家族激酶信号转导及细胞骨架蛋白质,导致骨髓间质黏附作用增强,促进细胞活化,增加细胞移行速度,强化细胞侵袭、转移能力,促进胶质母细胞肿瘤运动,促进疾病进展,影响其预后。

4 结 论

CML 患者较健康者 CFL1 表达水平较低,且年龄、白细胞计数、血小板计数、Ph 染色体、骨髓原始细胞百分比、CFL1 表达均为影响 CML 患者预后的相关危险因素。

参考文献

[1] 刘亚琳,王晓宁,刘华胜,等.慢性粒细胞白血病急粒变与

急淋变骨髓细胞形态学、免疫表型、细胞遗传学特征及预后差异分析[J].中国实验血液学杂志,2014,22(3):629-633.

- [2] 孙川,李倩,林颖,等.慢性粒细胞白血病额外染色体异常在加速期和急变期的意义[J].医学研究杂志,2014,43(1):108-110.
- [3] 董菲,张贵丽,张霞,等.转录因子 SOX4 及 C/EBP α 在慢性粒细胞白血病中的表达及其意义[J].白血病·淋巴瘤,2016,25(12):733-738.
- [4] 张之南.血液病诊断及疗效标准[M].北京:科学出版社,2007:126-128.
- [5] ZHANG B,LI L,HO Y,et al. Heterogeneity of leukemia-initiating capacity of chronic myelogenous leukemia stem cells[J]. J Clin Invest,2016,126(3):975.
- [6] 高玉萍,董平,刘永,等. WT1、VEGF 基因在急性白血病患者外周血中的表达及其意义[J]. 医学临床研究,2015,32(12):2454-2456.
- [7] 杜纳,骆丹,钱齐宏,等. 丝切蛋白-1 的表达对人皮肤鳞状细胞癌细胞增殖和迁移能力的影响[J]. 江苏医药,2014,40(6):621-623.
- [8] 武英伟,张志华,张茉莉,等. 复杂变异易位的慢性粒细胞白血病遗传学检查特点及预后分析[J]. 广东医学,2016,37(7):1021-1023.
- [9] BARRETT A J,ITO S. The role of stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia in the 21st century. [J]. Blood,2015,125(21):3230-3235.
- [10] JIN Y,ZHOU J,XU F,et al. Targeting methyltransferase PRMT5 eliminates leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia[J]. J Clin Invest,2016,126(10):3961.
- [11] 宋建新,张芹,梅芬,等. 慢性粒细胞白血病患者骨髓部分细胞因子的表达及意义[J]. 国际检验医学杂志,2016,37(23):3255-3257.
- [12] 杨惠军,黄彦勤,李婉丽. 儿童急性淋巴细胞白血病 bcl-1 的表达及意义[J]. 湖南师范大学学报(医学版),2011,8(1):12-16.
- [13] 何雯,王裴,张健,等. 缺氧条件下人肠上皮细胞丝切蛋白活化及其与带状闭合蛋白 1 分布的关系[J]. 中华烧伤杂志,2015,31(2):116-121.
- [14] 易晓雷,李旭辉,汪杰,等. 内皮细胞分化基因-1 和丝切蛋白-1 在原发性肝细胞癌中的表达及其与预后的关系[J]. 中华实验外科杂志,2013,30(10):2060-2063.
- [15] 阎华,丁浩,肖红,等. 丝切蛋白-1 及磷酸甘油酸激酶 1 在不同放疗敏感性星形胶质细胞瘤中的表达[J]. 中华神经外科杂志,2013,29(9):951-955.
- [16] HOCHHAUS A,ERNST T,EIGENDORFF E,et al. Causes of resistance and treatment choices of second- and third-line treatment in chronic myelogenous leukemia patients. [J]. Annals of Hematology,2015,2(2):133-140.

(收稿日期:2018-09-26 修回日期:2018-11-08)