

• 短篇论著 •

nm23-H1 基因及 HMGB1、LC3 Ⅱ 在 ALL 早期诊断中的应用及对化疗敏感性的影响

孙 敏¹, 李铁鑫²

(1. 青海省中医院检验科, 青海西宁 810000; 2. 北京市中医院检验科, 北京 101500)

摘 要:目的 分析骨髓单个核细胞(BMMNC)的 nm23-H1 基因及外周血高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)、Ⅱ型微管相关蛋白轻链 3(LC3 Ⅱ)水平在急性淋巴细胞白血病(ALL)早期诊断中的应用价值及对化疗敏感性的影响。方法 选取 2017 年 1 月至 2018 年 10 月间青海省中医院收治的 120 例 ALL 患者作为研究对象, 依照患者细胞形态学分为 L1、L2、L3 组, 选择本院同期体检健康者 40 例作为对照组; 检测 BMMNC 中自噬相关蛋白 5(Atg5)、BECLIN 基因编码蛋白-1(Beclin-1)、nm23-H1 基因编码蛋白-H1(nm23-H1)、转铁蛋白(TfR)、纤黏蛋白(FN)、LC3 Ⅱ及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的 mRNA 转录水平, 采用 Wester blot 法检测血清中高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)、LC3 Ⅱ、血小板源生性生长因子(PDGF)、血管内皮生长因子 A(VEGF-A)、血管内皮生长因子受体 1(VEGF-R1)、血管内皮生长因子受体 2(VEGF-R2)、血管内皮生长因子受体 3(VEGF-R3)及 GAPDH 蛋白表达量; 建立白血病细胞株分为 K562 组、HL-60 细胞组、非肿瘤细胞对照组, 检测 HMGB1 及 GAPDH 的 mRNA 及蛋白量表达, 通过基因转染使白血病细胞高表达 HMGB1, 用阿霉素(ADM)、长春新碱(VCR)处理细胞并采用四唑盐比色法(MTT)检测细胞存活率。结果 L3 期患者 BMMNC 中 Atg5、Beclin-1、nm23-H1、TfR、FN 及 LC3 Ⅱ水平均显著高于 L2 组及 L1 组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); L3 期患者血清中 HMGB1、LC3 Ⅱ、PDGF、VEGF-A、VEGF-R1、VEGF-R2、VEGF-R3 蛋白水平均显著高于 L2 组及 L1 组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); Atg5 mRNA、Beclin-1 mRNA、TfR mRNA、FN mRNA、LC3 Ⅱ mRNA、HMGB1 及 LC3 Ⅱ水平是影响 BMMNC 中 nm23-H1 基因水平的独立性因素($P < 0.05$); K562 组、HL-60 细胞组及非肿瘤细胞组中 HMGB1 水平存在明显差异, 且差异有统计学意义($P < 0.05$); ADM 及 VCR 干预过表达 HMGB1 的 K562 及 HL-60 细胞细胞存活率显著高于野生型, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 BMMNC 的 nm23-H1 基因及外周血 HMGB1、LC3 Ⅱ水平在评估患者病情是重要的生物学指标, 且高表达 HMGB1 可能降低化疗敏感性。

关键词: nm23-H1 基因; 外周血高迁移率族蛋白 B1; Ⅱ型微管相关蛋白轻链 3; 急性淋巴细胞白血病; 化疗敏感性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.20.029

中图法分类号: R733.71

文章编号: 1673-4130(2019)20-2551-04

文献标识码: B

白血病是现阶段临床中较为常见的起源于造血干细胞的恶性血液系统肿瘤之一^[1]。有研究结果指出, 白血病细胞在髓外及骨髓器官及组织中存在明显的恶性增殖, 并可能抑制患者体内正常造血功能, 但其具体的发病病因及机制尚未完全揭示^[2]。急性淋巴细胞白血病(ALL)由髓系细胞分化过程中出现的不同造血祖细胞恶化, 依照组织化学及细胞形态学特征为主要不同类型, 具有不同生物学特征^[3]。nm231 基因是人体内重要的一种分化抑制基因, 其最早从鼠 K-173 黑色素瘤细胞系中分离出来, 定位 17q21^[4]。有研究结果显示, 人类 nm23 基因家族中主要包括 nm23-H3、nm23-H2、nm23-H1 几种成员, 其中肿瘤预后及转移与 nm23-H1 基因存在显著密切关系^[5]。

但骨髓单个核细胞(BMMNC) nm23-H1 基因及外周血高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)、Ⅱ型微管相关蛋白轻链 3(LC3 Ⅱ)的联合应用检查仍鲜有报道^[6]。因而笔者对青海省中医院(下称本院)收治的 ALL 患者作为研究对象, 分析 BMMNC 的 nm23-H1 基因及外周血 HMGB1、LC3 Ⅱ水平在 ALL 早期诊断中的应用价值及对化疗敏感性的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 1 月至 2018 年 10 月间本院收治的 120 例 ALL 患者作为研究对象, 所有患者均已签署知情同意书并获本院伦理会审核和批准。依照患者细胞形态学分为 L1 组 40 例、L2 组 45 例和 L3 组 35 例, 其中 L1 组患者以小细胞为主, 染色质较

粗,胞质量少;L2 组患者以大细胞为主,且大小不一,核仁较大,染色质疏松,胞质量中等;L3 组以大细胞为主,大小一致,染色质西点状均匀,空泡易见。选择本院同期 40 例体检健康者作为对照组。L1 组中男 21 例、女 19 例,平均(43.98±4.29)岁,平均体质量(63.12±6.02)kg,L2 组中男 24 例、女 21 例,平均(44.19±4.64)岁,平均体质量(64.37±5.84)kg,L3 组中男 19 例、女 16 例,平均(45.92±6.33)岁,平均体质量(65.01±6.29)kg,对照组中男 20 例、女 20 例,平均(44.19±5.11)岁,平均体质量(64.01±5.28)kg,各组患者一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 纳入标准 参与本组研究所有患者均符合如下标准:(1)患者临床指征均符合《血液病诊断及疗效标准》^[7],患者伴有出血、发热、进行性贫血及骨关节疼痛等症状,且急性淋巴细胞数 $\geq 20\%$;(2)患者符合细胞形态学和分子生物学诊断,L1 组以小细胞为主,染色质较粗,胞质量少;L2 组以大细胞为主,且大小不一,核仁较大,染色质疏松,胞质量中等;L3 组以大细胞为主,大小一致,染色质西点状均匀,空泡易见;BCR 和 ABL 基因在 B 细胞中异常高表达及 SIL 和 TAL1 基因在 T 细胞中异常高表达;(3)所有患者均对本研究知情并签署知情同意书。排除标准 若患者符合如下任一标准则将其排除本研究:(1)合并肺部等其他脏器感染性疾病如呼吸道感染、急性肠道感染、动物源性病毒感染等;(2)伴随其他恶性肿瘤;(3)患者存系统性免疫疾病如过敏性鼻炎、支气管哮喘、荨麻疹;(4)患者主动申请退出本研究。

1.3 方法

1.3.1 主要试剂 聚合酶链反应(PCR)引物均购自南京金斯瑞生物科技有限公司;抗体均购买自南京福麦斯生物科技有限公司;Western Blot 检测试剂盒购买自沈阳万类生物科技有限公司;MTT 试剂盒购买自碧云天生物科技有限公司。

1.3.2 细胞分组及 MTT 检测细胞活性 建立白血病细胞株,分为 K562 组、HL-60 细胞组、非肿瘤细胞对照组,通过慢病毒转染法构建高表达 HMGB1 白细胞株,在 96 孔板中使用化疗药物(ADM、VCR)处理各组细胞后,避光加入 MTT 染料,后采用全自动酶标仪检测各孔吸光度,遵照试剂盒说明书进行操作。

1.3.3 RT-PCR 检测基因转录水平 (1)采用 TRIzol 法提取总 RNA,并检测 RNA 浓度,后使用 1 μ g RNA 样品逆转录制备 cDNA,参照试剂盒说明书设置反应体系。(2)检测骨髓单个核细胞中自噬相关基因 Atg5、Beclin-1、nm23-H1、TfR、FN、LC3 II 及 GAPDH 的 mRNA 转录水平。(3)使用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,采用凝胶图像分析检测结果。

1.3.4 Western bolt 法检测蛋白表达 去外周血细胞样品并制备蛋白样品,采用 SDS-PAGE 分离蛋白,后采用 Western blot 检测其中 HMGB1、LC3 II、PDGF、VEGF-A、VEGF-R1、VEGF-R2、VEGF-R3 及 GAPDH 蛋白表达量,遵照试剂盒说明书进行操作。

1.4 统计学处理 本组研究中采用 SPSS20.0 行统计学分析,满足正态分布的计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。计数资料用率(%)表示,行 χ^2 及方差分析。采用 Logistic 回归模型分析外周血各指标与骨髓单个核细胞 nm23-H1 基因的相关性,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞中 HMGB1 水平检测结果 本组研究结果显示,K562 组、HL-60 细胞组及非肿瘤细胞组中 HMGB1 水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 细胞中 HMGB1 水平检测结果($\bar{x}\pm s$)			
组别	HMGB1/GAPDH	<i>F</i>	<i>P</i>
K562 组	1.43±0.21	6.942	0.007
HL-60 细胞组	1.47±0.15		
非肿瘤细胞组	0.92±0.13		

2.2 细胞存活率检测结果 本组研究结果显示,ADM 及 VCR 干预过表达 HMGB1 的 K562 及 HL-60 细胞细胞存活率显著高于野生型,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.3 荧光定量 PCR 检测结果 本组研究结果显示,L1、L2 及 L3 组患者 BMMNC 中 Atg5、Beclin-1、nm23-H1、TfR、FN 及 LC3 II 水平均显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),且 L3 期患者 BMMNC 中 Atg5、Beclin-1、nm23-H1、TfR、FN 及 LC3 II 水平均显著高于 L2 组及 L1 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 2 细胞存活率检测结果($\bar{x}\pm s$)

药物	K562		<i>t</i>	<i>P</i>	HL-60		<i>t</i>	<i>P</i>
	野生型	过表达			野生型	过表达		
ADM	22.82±2.81	41.73±6.38	4.698	0.018	23.28±7.25	43.93±4.17	14.491	0.000
VCR	29.28±3.74	53.92±7.92	4.873	0.017	20.19±5.31	61.09±5.33	37.394	0.000

表 3 荧光定量 PCR 检测结果($\bar{x}\pm s$)

指标	L1 组	L2 组	L3 组	对照组	F	P
Atg5/GAPDH	2.68±0.23	3.31±0.19	3.73±0.18	1.02±0.21	5.342	0.012
LC3Ⅱ/GAPDH	0.55±0.07	0.79±0.12	1.02±0.11	0.23±0.04	4.182	0.018
Beclin-1/GAPDH	1.02±0.19	1.45±0.21	1.79±0.22	0.75±0.19	5.832	0.008
nm23-H1/GAPDH	1.23±0.13	1.45±0.11	1.98±0.09	0.94±0.12	6.381	0.003
TfR/GAPDH	0.53±0.05	0.78±0.09	0.98±0.12	0.24±0.04	8.912	0.000
FN/GAPDH	0.62±0.08	0.81±0.13	0.99±0.07	0.22±0.03	7.032	0.000

2.4 蛋白水平检测结果 本组研究结果显示,L1、L2 及 L3 组患者血清中 HMGB1、LC3Ⅱ、PDGF、VEGF-A、VEGF-R1、VEGF-R2、VEGF-R3 蛋白水平均显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),且 L3 期患者血清中 HMGB1、LC3Ⅱ、PDGF、VEGF-A、VEGF-R1、VEGF-R2、VEGF-R3 蛋白水平均显著高于 L2 组及 L1 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。

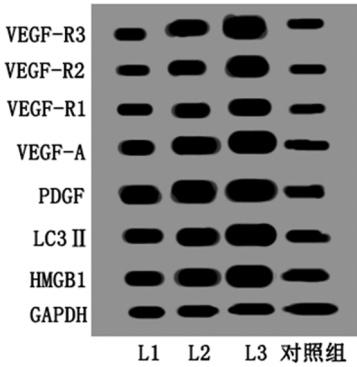


图 1 蛋白表达检测图

2.5 BMMNC 的 nm23-H1 基因与各指标相关性 本组研究结果显示,Atg5 mRNA、Beclin-1 mRNA、TfR mRNA、FN mRNA、LC3Ⅱ mRNA、HMGB1 及 LC3Ⅱ水平是影响 BMMNC 中 nm23-H1 基因水平的独立性因素($P<0.05$)。见表 4。

表 4 BMMNC 的 nm23-H1 基因与各指标相关性

指标	β	SE	Wald	P	OR
Atg5 mRNA	1.202	0.542	4.412	0.035	3.722
LC3Ⅱ mRNA	0.985	0.201	2.318	0.012	2.120
Beclin-1 mRNA	1.981	0.646	8.273	0.004	7.293
TfR mRNA	2.384	0.614	9.318	0.002	7.049
FN mRNA	2.091	0.601	5.943	0.021	4.012
HMGB1	0.766	0.831	1.831	0.022	1.321
LC3Ⅱ	0.372	0.736	1.284	0.011	1.283
PDGF	0.921	0.281	5.213	0.321	1.183
VEGF-A	0.683	0.687	4.692	0.501	3.329
VEGF-R1	1.072	0.816	6.319	0.472	2.411
VEGF-R2	1.093	0.528	2.034	0.698	1.714
VEGF-R3	0.981	0.709	2.693	0.218	1.829

3 讨论

急性淋巴细胞白血病作为血液恶性肿瘤之一,发病率有上升趋势,并且患者十年内总生存率低。急性淋巴细胞白血病的发生和发展机制尚未探究清楚,生物行为复杂。因此临床上急需特异的靶基因诊断白血病,使白血病患者能早诊断早治疗,并为今后白血病发病机制的研究提供新方向。

nm23-H1 基因定位于人 17p21-22,是人体内重要的抑癌基因,与多种癌症的发生发展和转移与 nm23-H1 异常表达密切相关,其中包括血液系统恶性肿瘤、乳腺癌、鼻咽癌和胰腺癌细胞等^[8-10]。在最新的血液系统恶性肿瘤研究发现,ALL 细胞中 nm23-H1 中呈明显的高表达状态。在正常成熟的骨髓细胞中,nm23-H1 基因表达的蛋白可有效诱导细胞因子 IL-6 和 IL-1 β 释放,IL-6 和 IL-1 β 可通过激活 NF-KB 及 STAT3 等细胞通道,从而增加细胞因子中集落刺激因子的表达以提高 ALL 细胞的成熟及存货^[11-12]。nm23-H1 基因不仅是重要的抑癌基因,也是公认的分化抑制因子,能有效抑制血细胞分化,可作为评估白血病预后质量的重要指标^[13]。

自噬是细胞生理和病理的常见现象,主要参与细胞凋亡,清除衰老的细胞器以及调控肿瘤的发生^[16]。近来有研究发现自噬也参与了白血病肿瘤细胞的耐药过程^[17],表明自噬可能参与白血病的发生和发展。而自噬基因 HMGB1 对氧化损伤、压力应激、遗传紊乱等多种因素引起的程序性细胞寻获条件下自噬调节具有十分重要的意义^[18]。研究指出,HMGB1 可控制胞内 Beclin1 复合物形成,加速出现自噬活性,在细胞凋亡的调节过程中起到重要的调节作用^[19]。有学者指出,靶向敲除细胞中 HMGB1 可有效减少出现饥饿诱导自噬促进细胞凋亡^[14]。在宫颈癌、结肠癌及肺癌等多种肿瘤细胞的发生及发展过程中,HMGB1 均起到十分重要的作用,并且通过临床生存率分析发现肿瘤患者生存率与 HMGB1 高表达密切相关^[15]。然而 nm23-H1 抑癌基因与自噬基因 HMGB1 在 ALL 发展中的分子作用关系尚未清楚,本研究基于此问题开展实验与分析。

本组研究中结果显示, ALL 患者 BMMNC 中 nm23-H1 的 mRNA 及蛋白水平显著高于对照组。且进一步分析结果发现, ALL 患者 BMMNC 中 nm23-H1 水平与血中 Atg5 mRNA、Beclin-1 mRNA、TfR mRNA、FN mRNA、LC3 II mRNA、HMGB1 及 LC3 II 水平呈显著正相关关系。但与 PDGF、VEGF-A、VEGF-R1、VEGF-R2 及 VEGF-R3 无明显关系。此结果表明 ALL 患者中 nm23-H1 基因以及自噬相关基因高表达, 提示 nm23-H1 表达的升高可能与自噬基因 HMGB1 的表达相关。在慢病毒转染细胞高表达 HMGB1 之后, nm23-H1 的表达也随之升高, 证明 HMGB1 高表达可提高 nm23-H1 的表达。通过过表达 HMGB1 可延长 K562 及 HL-60 细胞的活力, 对抗细胞凋亡, 降低化疗药物的敏感性。在多种细胞株中敲除 HMGB1 基因有效抑制自噬的发生, 且减少 HMGB1 移位。据此结果分析, HMGB1 基因在自噬调节过程中起到十分重要的作用, 可有效调节细胞及组织中的自噬作用, 并减少急性淋巴细胞凋亡。因此, nm23-H1 基因可能与 HMGB1 表达密切相关, nm23-H1 可能参与 HGMB1 的自噬凋亡信号级联通路, 并基于此通路从而促进肿瘤细胞逃避细胞凋亡。

综上所述, BMMNC 的 nm23-H1 基因及外周血 HMGB1、LC3 II 水平在评估患者病情是潜在的重要生物学指标, 且高表达 HMGB1 可能降低化疗敏感性。但本研究并未对患者进行长期随访研究, 有待后续深入研究。

参考文献

- [1] WU Y, LI Y, ZHAO X, et al. Combined detection of the expression of Nm23-H1 and p53 is correlated with survival rates of patients with stage II and III colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(1):129-136.
- [2] OZTURK E, AKSOY S A, UGRAS N, et al. Coexistence of MACC1 and NM23-H1 dysregulation and tumor budding promise early prognostic evidence for recurrence risk of early-stage colon cancer[J]. *APMIS*, 2018, 126(2):99-108.
- [3] 潘请. miR-125a-3p 在急性髓系白血病患者外周血中的表达及作用机制研究[D]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2016.
- [4] WANG Z, LI L, WANG Y. Effects of Per2 overexpression on growth inhibition and metastasis, and on MTA1, nm23-H1 and the autophagy-associated PI3K/PKB signaling pathway in nude mice xenograft models of ovarian cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(6):4561-4568.
- [5] QU S, LI X Y, LIANG Z G, et al. Protein expression of nucleophosmin, annexin A3 and nm23-H1 correlates with human nasopharyngeal carcinoma radioresistance in vivo[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(1):615-620.
- [6] 刘晓蕾, 刘丽英. 自噬在儿童急性淋巴细胞白血病发生中的作用[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2017, 32(15):1184-1186.
- [7] 张之南. 液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 2007:271.
- [8] ZHANG L, LI L, WEI H, et al. Transcriptional factor FOXO3 negatively regulates the expression of nm23-H1 in non-small cell lung cancer[J]. *Thorac Cancer*, 2016, 7(1):9-16.
- [9] 赵志平, 李健, 王云超, 等. LncRNA LOC100506123 对胰腺癌细胞增殖及迁移的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2017, 39(9):840-845.
- [10] SHENG Y, XU M, LI C, et al. Nm23-H1 is involved in the repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks in the A549 lung cancer cell line[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):710.
- [11] CEKIC C, LINDEN J. Purinergic regulation of the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(3):177-192.
- [12] CHAKRAVARTI D, HONG R. SET-ting the stage for life and death[J]. *Cell*, 2003, 112(5):589-591.
- [13] 袁小芬. 白血病细胞诱导分化过程中 nm23-H1 表达变化及分子调控机制的研究[D]. 济南: 济南大学, 2016.
- [14] GUHA M, SAARE M, MASLOVSKAJA J, et al. DNA breaks and chromatin structural changes enhance the transcription of autoimmune regulator target genes[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(16):6542-6554.
- [15] PANDAY A, GROVE A. The high mobility group protein HMO1 functions as a linker histone in yeast[J]. *Epi-genetics Chromatin*, 2016, 9:13.
- [16] GALLUZI L, BAHRECKE E, BALLABIO A, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes[J]. *EMBO J*, 2017, 36(13):1811-1816.
- [17] 杨秀丽, 唐庆华, 于洋. 自噬基因 ATG7、ATG12 在成人急性淋巴细胞白血病骨髓单个核细胞中的表达及意义[J]. *武汉大学学报*, 2019, 40(2):239-242.
- [18] 郭春燕. HMGB1 影响小鼠黑素瘤 B16 细胞自噬作用的机制研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2016.
- [19] WU C H, LIN Y W, WU T F, et al. Clinical implication of voltage-dependent anion channel 1 in uterine cervical cancer and its action on cervical cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(4):4210-4225.

(收稿日期: 2019-01-26 修回日期: 2019-04-18)