

NT5C2基因在儿童急性白血病中的表达及其临床意义

王艳珍 安曦洲 刘江华 张妮 刘志娟 梁绍燕 于洁

【摘要】 目的 探讨核苷类似物代谢相关基因NT5C2在儿童急性白血病(AL)患者骨髓样本中的表达及其临床意义。**方法** 采用实时荧光定量PCR和免疫组织化学染色法检测63例初诊、15例完全缓解和7例复发AL患儿NT5C2 mRNA及蛋白水平,以16例非恶性血液系统疾病患儿作为对照。分析NT5C2在AL患儿中的表达及其与临床指标的关系。**结果** ①NT5C2 mRNA在初诊急性B淋巴细胞白血病(B-ALL)、急性T淋巴细胞白血病(T-ALL)、急性髓系白血病(AML)和对照组的表达水平分别为1.16(0.89~2.25)、0.96(0.74~1.25)、1.66(0.84~3.15)和0.88(0.61~1.21)。其中AML($P<0.01$)、B-ALL($P<0.05$)的表达水平显著高于对照组;T-ALL的表达水平与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。动态观察NT5C2 mRNA在15例AL患儿不同治疗阶段的表达变化,完全缓解后表达水平明显降低($P<0.01$)。复发AL患儿的NT5C2 mRNA水平显著高于缓解组及对照组($P<0.01$)。②免疫组织化学染色检测显示NT5C2蛋白水平与mRNA水平趋势一致。③在AML、T-ALL患儿组中NT5C2 mRNA表达水平与危险度分级呈正相关(r 值分别为0.434、0.389, P 值均 <0.05)。④NT5C2高表达组AML患儿的诱导缓解化疗第9天骨髓不缓解率(35.2%对0)、巩固治疗前骨髓不缓解率(25.0%对0)、微小残留病阳性率(36.4%对14.3%)和复发率(38.5%对28.6%)均高于低表达组,但差异无统计学意义(P 值均 >0.05)。**结论** NT5C2高表达是儿童AL预后不良相关危险因素,有望成为指导个体化化疗、判断预后、监测复发的指标。

【关键词】 基因,NT5C2; 白血病; 儿童; 危险因素; 核苷类似物耐药

NT5C2 expression in children with acute leukemia and its clinical significance Wang Yanzhen, An Xizhou, Liu Jianghua, Zhang Ni, Liu Zhijuan, Liang Shaoyan, Yu Jie. Department of Hematologic Neoplasm, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China
Corresponding author: Yu Jie, Email: 1808106657@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression level and analyze the clinical significance of NT5C2, which is a nucleoside analogues metabolism related gene, in children with acute leukemia(AL). **Methods** Real-time PCR and immunohistochemistry were presented to detect the level of NT5C2 mRNA and its protein product cN- II in bone marrow samples of 63 patients initially diagnosed with AL, 15 patients who achieved complete remission, 7 patients who relapsed and 16 non-hematologic malignancie controls. The expression of NT5C2 mRNA in different groups of AL and its relevance with clinical indicators were analyzed. **Results** ①The expression of NT5C2 mRNA in newly diagnosed B-ALL, T-ALL, AML and controls were 1.16(0.89~2.25), 0.96(0.74~1.25), 1.66(0.84~3.15) and 0.88(0.61~1.21), respectively. NT5C2 mRNA expression in AML($P<0.01$)and B-ALL($P<0.05$) cases were higher than that in controls; NT5C2 mRNA expression in T-ALL and in controls showed no significant difference ($P>0.05$). Changes of NT5C2 mRNA level were observed between preliminary diagnosis and complete remission in 15 patients. NT5C2 mRNA levels were significantly decreased in complete remission stage than that in newly diagnosis AL ($P<0.01$). NT5C2 mRNA levels of relapsed-refractory group were higher than that of complete remission group and controls ($P<0.01$). ②Immunohistochemical staining results revealed that NT5C2 protein levels were consistent with the trend of mRNA levels. ③NT5C2 mRNA levels in AML ($r=0.434$) and T-ALL ($r=0.389$) were positively correlated with risk classification ($P<0.05$). ④During chemotherapy of patients with AML, the NR rate of bone marrow in NT5C2 high expression group

was higher than that of low expression group after 9 days induction chemotherapy (35.2% vs 0) and before consolidation therapy (25.0% vs 0); The positive rate of minimal-residual disease (36.4% vs 14.3%) and relapse rate of AL (38.5% vs 28.6%) were increased in NT5C2 high expressed patients than that in low expressed patients, but all the differences were insignificant ($P>0.05$). **Conclusions** High expression of NT5C2 was found to be a related risk factor of AL children with unfavourable prognosis. NT5C2 promises a new target for guiding individualized chemotherapy and evaluating the prognosis of childhood acute leukemia and monitoring recurrence.

【Key words】 Gene, NT5C2; Leukemia; Children; Risk factors; Drug resistance in nucleoside analogues

急性白血病(AL)发病率居儿童恶性肿瘤首位,严重威胁患儿的生命健康。目前儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)5年无事件生存(EFS)率可达到76%~86%,急性髓系白血病(AML)达49%~63%^[1-2],但仍有部分患儿持续不缓解或复发,预后较差。识别新的危险因素并针对性调整治疗,是改善预后的重要途径。

NT5C2基因位于10q24.32,广泛表达于人类各组织细胞,编码的胞质蛋白cN-II属于5'-核苷酸酶(5'-nucleotidase, 5'-NT)家族。5'-NT从5'端水解单磷酸核苷(GMP、IMP、AMP),参与调节和稳定核苷酸库,维持细胞的正常生理功能^[3]。

抗肿瘤核苷类似物是治疗AL的重要化疗药物^[4],经激酶磷酸化生成单磷酸盐后才能进一步代谢生成活性产物,阻碍DNA合成。cN-II既有5'-NT的水解功能,同时对抗病毒、抗肿瘤核苷类似物的单磷酸盐具有去磷酸化作用^[4]。有研究者认为ALL患儿的胞质5'-NT活性升高可能是导致6-巯嘌呤(6-MP)耐药的重要因素^[5]。阿糖胞苷(Ara-C)的单磷酸盐Ara-CMP可能作为cN-II的底物被降解,减少Ara-CTP的累积浓度,从而降低AML患者对Ara-C的敏感性^[4,6]。对成人AML^[7-8]、骨髓增生异常综合征^[9]、肺癌^[10]等疾病的研究提示初诊时高表达NT5C2的患者预后不良。

目前关于NT5C2在儿童AL中的表达和作用报道较少。我们从mRNA和蛋白水平检测NT5C2在各类型AL患儿不同治疗阶段的表达情况,分析其与临床MICM分型、危险度分级、早期治疗反应等预后相关因素之间的关系,探讨NT5C2在儿童AL中的作用及临床意义,以期寻找新的危险因素和治疗靶点。

对象和方法

一、研究对象

收集2013年1月至2014年3月在重庆医科大

学附属儿童医院住院和门诊治疗的63例初诊AL患儿(B-ALL 24例, T-ALL 15例, AML 24例)的骨髓标本,男40例,女23例,中位年龄5.7(3.2~9.6)岁,均经骨髓检查确诊并行MICM分型评估。收集7例复发AL患儿(B-ALL 3例, AML-M_{2a} 4例)骨髓标本,中位年龄7.6(6.1~9.4)岁。以16例非恶性血液系统疾病患儿骨髓标本作为对照。患儿初诊时均未接受过白血病相关治疗。其中4例患儿在确诊后放弃治疗,6例患儿中途失访,其余患儿均正在进行或已完成规范化疗。研究获得本单位伦理委员会的批准和患儿监护人的知情同意。

B-ALL、T-ALL患儿均按照CCLG-2008方案^[11]治疗,诱导缓解率分别为95.7%(22/23)、92.3%(12/13),复发率分别为14.3%(3/21)、25.0%(3/12)。AML患儿按照重庆医科大学附属儿童医院AML-2010方案(在AML-2006方案^[12]基础上调整)治疗,诱导缓解率为82.6%(19/23),复发率为35.0%(7/20)。AL患儿总体诱导缓解率为89.8%(53/59),收集其中15例患儿(B-ALL 9例, T-ALL 1例, AML 5例)完全缓解期的骨髓标本用于动态监测。

二、危险度分级标准和所纳入临床指标

1. 危险度分级标准: ALL和AML患儿分别依据CCLG-2008方案和中华医学会儿科学分会血液学组AML-2006诊疗建议确诊并依据临床危险度分级标准^[11-12]进行分级。24例B-ALL患儿中标危、中危、高危组各8例;15例T-ALL患儿中中危组6例,高危组9例;24例AML患儿中中危组9例,高危组15例。

2. 预后相关遗传学异常:

ALL遗传学预后分组^[1]: 预后良好: 正常染色体、染色体数目超过50的超二倍体、t(8;21)(RUNX1-RUNXT, AML1-ETO)、t(12;21)(ETV6-RUNX1, TEL-AML1)。预后中等: t(1;19)(E2A-PBX1)。预后差: 亚二倍体、近单倍体、t(9;22)

(BCR-ABL, Ph⁺)、MLL重排、t(8;14)或复合染色体异常。

AML遗传学预后分组^[1-2]:预后良好:inv(16)(CBFB-MYH11)、t(8;21)(RUNX1-RUNX2)、t(15;17)(PML-RAR α)。预后中等:正常核型、+8、t(8;16)、t(16;21)、t(9;11)(MLL-AF9)、del(7q)、del(9q)及其他未定义的异常核型。预后不良:复杂核型(\geq 3种异常)、-5、-7、5q-、7q-、除t(9;11)外的11q23异常(如MLL-AF4)、inv(3)、t(6;9)、t(1;22)、t(7;22)、t(9;22)(BCR-ABL)。

3. 纳入分析的临床指标:初诊时一般情况及实验室指标,包括性别、年龄、肝脾淋巴结情况、初诊时外周血白细胞计数、血小板计数、血红蛋白水平、免疫分型、融合基因、染色体。早期治疗反应:ALL包括泼尼松敏感试验、诱导缓解治疗第15天骨髓象、第33天骨髓象,AML包括诱导缓解治疗第9天骨髓象、巩固治疗前骨髓象;随访截止前整个治疗过程中的MRD及复发情况。

三、主要试剂和仪器

TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒及SYBR Green II荧光染料购自日本TaKaRa公司,即用型免疫组化ElivisionTM Super试剂盒及DAB显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司;NT5C2多克隆抗体购自美国Abcam公司;CFX 96 Cycler荧光定量PCR仪为美国Bio-Rad公司产品。

四、方法

1. 骨髓标本收集及细胞涂片制备:收集骨髓标本1 ml,加入红细胞裂解液充分裂解,常规离心分离骨髓单个核细胞(BMMNC)。用PBS重悬调整细胞密度为 10^6 /ml,取10 μ l涂在防脱玻片上,4%多聚甲醛固定30 min, PBS冲洗后-20 $^{\circ}$ C保存备用。向剩余细胞中加入800 μ l培养基、100 μ l FBS、100 μ l DMSO制备细胞悬液,-80 $^{\circ}$ C保存备用。

2. 实时荧光定量PCR检测NT5C2 mRNA表达:按TRIzol试剂说明书提取BMMNC总RNA,检测RNA纯度及浓度,吸光度(A)₂₆₀/A₂₈₀在1.8~2.1并且RNA浓度在200 ng/ μ l以上可用于后续逆转录合成cDNA。按TaKaRa公司逆转录试剂盒说明书进行操作,逆转录合成cDNA。以cDNA为模板进行实时荧光定量PCR。NT5C2的引物序列:上游5'-ACCTGCTGTATTACCCTTTCAGCTA-3';下游5'-GCTCCACCGTTGATTCATGA-3',扩增产物长度为75 bp;内参基因 β -actin的引物序列:上游5'-

AAGATGACCCAGATCATGTTTGGAGACC-3',下游5'-GCCAGGTCCAGACGCGGAT-3',扩增产物长度191 bp。引物经Primer BLAST比对验证并由上海英骏生物工程有限公司合成。PCR扩增条件:95 $^{\circ}$ C预变性30 s,95 $^{\circ}$ C变性10 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸20 s,共40个循环。记录样本的循环阈值(CT值)并计算其平均值,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量法计算NT5C2 mRNA在各组的表达水平。 $\Delta CT = CT_{NT5C2} - CT_{\beta\text{-actin}}$, $\Delta\Delta CT = \text{疾病组}\Delta CT - \text{对照组}\Delta CT$ 。

3. 免疫组织化学染色法检测cN- II蛋白表达:取出细胞涂片复温30 min,3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶活性10 min, PBS洗5 min,重复2次,山羊血清封闭20 min。加cN- II一抗(1:400)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,阴性对照组由PBS替代一抗。次日复温30 min, PBS洗5 min,重复2次。按试剂盒说明进行二抗孵育,DAB显色,苏木素染细胞核, PBS终止反应,室温晾干,中性树胶封固后显微镜下观察拍照。

4. 免疫组织化学染色结果判读:cN- II蛋白表达定位于细胞质,胞质染为棕黄色判读为阳性。每张玻片在高倍镜($\times 400$)下随机选取5个视野观察染色强度并计算阳性细胞百分率。染色强度评分:无着色为0分,浅黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。阳性细胞百分率评分:<5%为0分,5%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分。两者分数相加:<2分为不表达(-),2~3分为低度表达(+),4~5分为中度表达(++),6~7分为高度表达(+++)。0~3分为阴性表达,4~7分为阳性表达。

五、统计学处理

采用SPSS 17.0和Graphpad Prism 5软件进行统计学分析。偏态分布计量资料以 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示,两组间比较采用非参数Mann-Whitney检验,多组间多重比较采用Kruskal-Wallis检验,Bonferroni法校正检验水准;相关性分析采用Spearson检验。样本率的比较采用卡方检验或Fisher确切概率法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. NT5C2 mRNA在白血病组和对照组中的表达:NT5C2 mRNA在初诊B-ALL、T-ALL、AML组的表达水平分别为1.16(0.89~2.25)、0.96(0.74~1.25)、1.66(0.84~3.15),在完全缓解组和复发组的表达水平分别为0.84(0.61~1.20)、1.41(1.19~2.34),在对照组中的表达水平为0.88(0.61~1.21)。其中初

诊AML($P<0.01$)、B-ALL($P<0.05$)组NT5C2 mRNA的表达水平显著高于对照组,初诊T-ALL组与对照组差异无统计学意义($P>0.05$);不同类型初诊AL组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。NT5C2 mRNA的表达水平在复发组高于完全缓解组及对照组($P<0.05$),完全缓解组与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。动态观察15例AL患儿治疗前后NT5C2的表达变化,完全缓解期间显著低于初诊时($P<0.05$)(图1)。

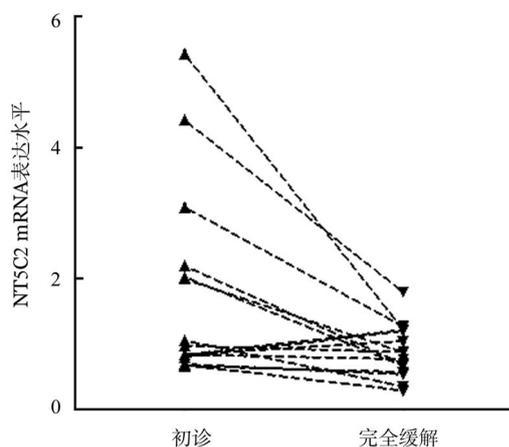


图1 实时荧光定量PCR方法检测NT5C2 mRNA在15例急性白血病患者不同治疗阶段的表达

7例复发患儿均在初诊后10~36个月复发,其中5例接受再次化疗(另外2例放弃治疗),3例达第2次缓解(另外2例不缓解,放弃治疗)。达第2次缓解的患儿中1例再次复发后放弃治疗,1例失访,1例在后续治疗过程中反复复发2次后放弃治疗。该反复复发患儿为女性,初诊年龄8岁2个月,骨髓细胞学检查提示AML-M_{2a}型,融合基因HOX11(+)(未检测到其他异常融合基因),染色体检查提示复杂核型,入高危组。经化疗达第1次完全缓解,4个月后接受了同胞骨髓造血干细胞移植,术后4个月骨髓复发,接受再次化疗达到第2次完全缓解,1年后又反复复发2次放弃治疗。我们收集到该患儿不同

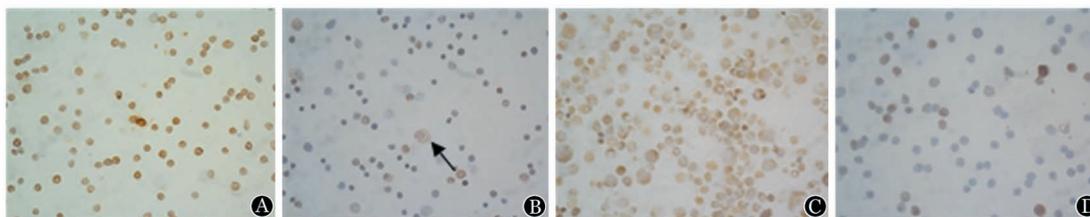
治疗阶段的骨髓标本,其NT5C2 mRNA表达水平分别为:初诊1.98,第1次完全缓解1.09,第1次复发2.85,第2次完全缓解0.53。

2. cN- II蛋白在白血病患者和对照组的表达: NT5C2蛋白cN- II在初诊B-ALL、AML、T-ALL组的阳性表达率分别为79.17% (19/24)、87.50% (21/24)、33.33% (5/15),在对照组为13.33% (2/15)。B-ALL、AML组阳性表达率显著高于对照组($P<0.01$),T-ALL组与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)(图2)。cN- II蛋白与NT5C2 mRNA的表达结果趋势一致。

3. NT5C2表达水平与白血病临床指标的关系: 在AML、T-ALL中,高危组的NT5C2 mRNA表达水平显著高于中危组(P 值均 <0.05);在B-ALL中,中、高危组作为一个整体NT5C2 mRNA表达水平高于标危组,但差异无统计学意义($P=0.072$)。Pearson相关分析发现NT5C2表达水平与AML($r=0.434$)、T-ALL($r=0.389$)的危险度分级呈正相关(P 值均 <0.05),与B-ALL的危险度分级相关性不显著($r=0.382$, $P=0.070$),与性别、年龄、肝脾淋巴结肿大、初诊WBC、PLT、HGB水平、预后不良融合基因等无明显相关性。NT5C2表达水平还与AML中遗传学预后分组呈正相关($r=0.585$, $P=0.022$)(表1)。

4. NT5C2表达水平与治疗反应的关系: 将NT5C2 mRNA表达量高于总体样本(包括对照组)中位数定义为高表达^[7]。在B-ALL、T-ALL、AML组中分别有58.3%、60.0%、70.8%的患儿高表达NT5C2 mRNA。

卡方检验结果显示,在AML患儿化疗过程中,诱导缓解方案第9天骨髓不缓解率($P=0.070$)、巩固治疗前骨髓不缓解率、MRD阳性率及复发率在NT5C2高表达组均高于低表达组,但差异无统计学意义(P 值均 >0.05)。在B-ALL、T-ALL患儿化疗过程中,VLDL方案诱导治疗第15天骨髓不缓解率、第33天骨髓不缓解率、MRD阳性率及复发率在



A:急性B淋巴细胞白血病;B:急性T淋巴细胞白血病;C:急性髓系白血病;D:对照组

图2 免疫组织化学染色法检测cN- II蛋白在各类型白血病中的表达($\times 400$)(箭头所示为染色阳性细胞)

NT5C2高表达组均高于低表达组,但差异亦无统计学意义(P 值均 >0.05)(表2)。

Pearson 相关分析结果显示,在 AML 患儿中 NT5C2 高表达与诱导缓解第 9 天骨髓不缓解($r=0.541$)、巩固治疗前骨髓不缓解($r=0.522$)、MRD 阳性($r=0.508$)具有相关性(P 均 <0.05);与复发无明显相关性;B-ALL、T-ALL 患儿 NT5C2 高表达与泼尼松试验不敏感、VDLD 方案诱导治疗第 15 天骨髓不缓解、第 33 天骨髓不缓解、MRD 阳性、复发等指标无明显相关性(P 值均 >0.05)。

讨 论

核苷类似物化疗耐药是影响 AL 预后的重要因素。

目前认为降低 Ara-CTP 累积浓度的因素是导致 Ara-C 耐药的主要原因^[13],包括膜核苷转运蛋白和脱氧胞苷激酶(dCK)缺失、胞苷脱氨酶的去氨基作用增强,及另外一个可能的重要因素:5'-NT 参与 Ara-C 的分解代谢。单磷酸核苷可作为 cN- II 的底物被降解,cN- II 酶的活性和浓度均有可能影响核苷代谢速率。在慢性淋巴细胞白血病患者中氟达拉滨单磷酸盐的降解速率与 cN- II 的酶活性相关^[14]。多项研究认为 cN- II 参与核苷类似物的分解代谢,导致化疗耐药,但是都没有直接证据支持^[3]。

Meyer^[15]和 Tzoneva 等^[16]发现有 3%~19% 复发 ALL 患儿携带 NT5C2 突变,且突变仅在复发时出现,突变蛋白酶活性增强,携带该突变的白血病细

表1 63例初诊急性白血病患儿的NT5C2 mRNA表达水平和临床指标的关系[M(P_{25} ~ P_{75})]

因素	B-ALL			T-ALL			AML		
	例数	NT5C2水平	P 值	例数	NT5C2水平	P 值	例数	NT5C2水平	P 值
性别			0.501			0.674			0.805
男	15	1.73(0.85~2.11)		11	0.93(0.87~1.88)		13	1.55(0.86~3.35)	
女	9	1.69(1.05~2.25)		4	1.03(0.74~2.03)		11	1.54(1.20~2.70)	
年龄(岁)			0.722			0.796			0.680
1~10	17	1.20(0.92~2.01)		12	0.96(0.74~1.25)		14	1.45(0.86~3.73)	
<1或≥10	7	1.46(0.95~2.25)		3	2.73(0.67~4.79)		10	1.66(0.95~2.46)	
WBC			0.231			0.873			0.276
<50×10 ⁹ /L	17	1.20(0.86~1.99)		6	1.00(0.68~2.02)		11	1.77(1.08~3.92)	
≥50×10 ⁹ /L	7	1.73(1.22~2.70)		9	0.96(0.80~1.87)		13	1.54(1.05~2.28)	
融合基因预后分组			0.824 ^a			0.731			0.384
良好	16	1.13(0.85~2.25)		9	0.96(0.73~1.40)		12	1.54(0.86~3.35)	
差	8	1.40(0.94~2.33)		4	0.94(0.75~2.72)		8	2.03(0.83~3.44)	
染色体预后分组			0.058			0.630			0.018
良好	17	1.04(0.88~1.58)		11	0.96(0.82~1.87)		6	1.07(0.83~1.39)	
差	7	1.40(0.98~2.60)		2	0.87(0.79~1.23)		16	1.83(1.19~3.23)	
危险度分级			0.072 ^b			0.032 ^c			0.021 ^c
标危	8	1.03(0.83~1.61)		0	0		0		
中危	8	1.65(1.03~2.24)		6	0.79(0.67~0.84)		9	1.33(0.83~1.55)	
高危	8	1.94(1.04~2.93)		9	1.06(0.99~2.91)		15	2.18(1.30~3.66)	

注:B-ALL:急性B淋巴细胞白血病;T-ALL:急性T淋巴细胞白血病;AML:急性髓系白血病。*:预后良好(不包括预后中等)与预后差比较;^b:高危组与中危组作为一个整体与标危组比较;^c:高危组与中危组比较;统计学方法采用非参数检验中的Mann Whitney U检验

表2 NT5C2 mRNA表达水平差异对急性白血病患儿治疗反应的影响[% (阳性例数/观察例数)]

治疗反应	B-ALL			T-ALL			AML		
	高表达 (14例)	低表达 (10例)	P 值	高表达 (9例)	低表达 (6例)	P 值	高表达 (17例)	低表达 (7例)	P 值
泼尼松诱导不敏感	23.1(3/13)	10.0(1/10)	0.404	25.0(2/8)	33.3(2/6)	0.594			
D15/D9骨髓不缓解 ^a	27.3(3/11)	10.0(1/10)	0.331	62.5(5/8)	33.3(2/6)	0.296	35.2(6/17)	0(0/7)	0.070
D33/巩固治疗前骨髓不缓解	14.3(2/14)	0(0/9)	0.360	12.5(1/8)	0(0/6)	0.571	25.0(4/16)	0(0/7)	0.206
MRD阳性	27.3(3/11)	11.1(1/9)	0.375	37.5(3/8)	16.7(1/6)	0.406	36.4(4/11)	14.3(1/7)	0.324
复发	18.2(2/11)	10(1/10)	0.538	25.0(2/8)	16.7(1/6)	0.615	38.5(5/13)	28.6(2/7)	0.520

注:^a急性淋巴细胞白血病(ALL)患儿诱导治疗第15天(D15)、急性髓系白血病(AML)患儿诱导治疗第9天(D9)骨髓不缓解。微小残留病(MRD)检测方法采用流式细胞术,MRD≥10⁻⁴定义为阳性。在治疗过程中部分患儿的某些临床指标失访或未进行检测或放弃在本院继续治疗,导致与初诊例数不符。统计学方法采用Fisher确切概率法

胞对核苷类似物化疗耐药。Meyer 等^[17]认为这一发现提示源于化疗的选择性压力的存在,核苷类似物在 AL 维持治疗阶段起重要作用,NT5C2 突变可能是导致耐药和复发的重要原因。

我们分别采用实时荧光定量 PCR 和免疫组织化学染色法检测了 NT5C2 在儿童 AL 各治疗阶段的表达情况,发现在初诊 B-ALL、AML 及复发组中 NT5C2 表达均高于对照组,并且随着肿瘤细胞减少和病情缓解,NT5C2 表达显著下降,提示 NT5C2 在肿瘤细胞中高表达。有研究发现初诊成人 AML 患者中有 54% 高表达 NT5C2^[18],与本研究结果一致。我们发现 NT5C2 表达水平与 AML 危险度分级、早期治疗反应及 MRD 呈正相关。国外研究发现初诊时高表达 NT5C2 的成人 AML 患者无病生存和总生存期较短,早期复发率高^[7];经 Ara-C 治疗的 AML 和高危 MDS 患者,初诊时 cN- II 高表达者 DFS 和 OS 期均较短^[8-9];高表达 NT5C2 的非小细胞肺癌患者预后差,下调 NT5C2 表达能够增强肺癌细胞对吉西他滨的敏感性^[10]。NT5C2 mRNA 水平越高,白血病细胞对 Ara-C 的敏感性越低^[19]。以上研究结果提示 cN- II 表达水平与 AL 临床预后相关,cN- II 可能参与了核苷类似物的耐药机制。此外,我们还发现 AML 患儿的 NT5C2 表达水平与染色体异常提示的预后不良相关,与 Galmarini 等^[8]在成人 AML 患者中的研究结果一致。本研究首次发现 NT5C2 在 AL 患儿与非恶性血液病患儿间的表达差异,可能因病例数少,部分临床指标统计学差异不显著,需进一步扩大样本量来研究证实。

参考文献

- [1] Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update [J]. Clin Oncol, 2011, 29(5):551-565.
- [2] 郑伟才,李志光. 儿童急性髓系白血病的治疗[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2010, 15(5):193-202.
- [3] Filoni DN, Pesi R, Careddu MG, et al. Initial studies to define the physiologic role of cN- II [J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2011, 30(12):1155-1160.
- [4] Tozzi MG, Camici M, Pesi R, et al. Nucleoside phosphotransferase activity of human colon carcinoma cytosolic 5'-nucleotidase [J]. Arch Biochem Biophys, 1991, 291(2):212-217.
- [5] Pieters R, Huismans DR, Loonen AH, et al. Relation of 5'-nucleotidase and phosphatase activities with immunophenotype, drug resistance and clinical prognosis in childhood leukemia[J]. Leuk Res, 1992, 16(9):873-880.
- [6] Hubeek I, Stam RW, Peters GJ, et al. The human equilibrative nucleoside transporter 1 mediates in vitro cytarabine sensitivity in childhood acute myeloid leukaemia[J]. Br J Cancer, 2005, 93(12):1388-1394.
- [7] Galmarini CM, Thomas X, Calvo F, et al. Potential mechanisms of resistance to cytarabine in AML patients[J]. Leuk Res, 2002, 26(7): 621-629.
- [8] Galmarini CM, Thomas X, Graham K, et al. Deoxycytidine kinase and cN- II nucleotidase expression in blast cells predict survival in acute myeloid leukaemia patients treated with cytarabine[J]. Br J Haematol, 2003, 122(1):53-60.
- [9] Suzuki K, Sugawara T, Oyake T, et al. Clinical significance of high-Km 5'-nucleotidase (cN-II) mRNA expression in high-risk myelodysplastic syndrome [J]. Leuk Res, 2007, 31(10):1343-1349.
- [10] Li L, Schaid DJ, Fridley BL, et al. Gemcitabine metabolic pathway genetic polymorphisms and response in patients with non-small cell lung cancer[J]. Pharmacogenet Genomics, 2012, 22(2):105-116.
- [11] 王方,金润铭. 儿童急性淋巴细胞白血病治疗效果及预后影响因素的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.
- [12] 顾龙君,吕善根,卢新天,等. 儿童急性髓系细胞白血病诊疗建议 [J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(11):877-878.
- [13] Galmarini CM, Thomas X, Calvo F. Mechanisms of resistance to cytarabine in relapsing acute myeloid leukemia (AML) patients [J]. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), 1999, 94: Abstract1249.
- [14] Albertioni F, Bayat N, Karlsson K, et al. Clinical Pharmacology of New Agents Activity profiles of 5' - nucleotidases in peripheral blood cells from patients with untreated B- cell chronic lymphocytic leukemia: correlation to anti- cancer nucleoside- monophosphate degrading activity [J]. Cancer Res, 2005, 65(5):935-936.
- [15] Meyer JA, Wang J, Hogan LE, et al. Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Nat Genet, 2013, 45(3):290-294.
- [16] Tzoneva G, Perez- Garcia A, Carpenter Z, et al. Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL [J]. Nat Med, 2013, 19(3):368-371.
- [17] Meyer JA, Carroll WL, Bhatla T, et al. Screening for gene mutations: will identification of NT5C2 mutations help predict the chance of relapse in acute lymphoblastic leukemia? [J]. Hematol, 2013, 6(3):223-224.
- [18] Galmarini CM, Graham K, Thomas X, et al. Expression of high Km 5'- nucleotidase in leukemic blasts is an independent prognostic factor in adults with acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2001, 98(6): 1922-1926.
- [19] Galmarini CM, Cros E, Thomas X, et al. The prognostic value of cN-II and cN-III enzymes in adult acute myeloid leukemia [J]. Haematologica, 2005, 90(12):1699-1701.

(收稿日期:2015-01-13)

(本文编辑:王叶青)