

hMTH1在急性淋巴细胞白血病患者中的表达及其临床意义

范国琴 陈丽丽 张之尧 闫志凌 陈翀 李德鹏 徐开林 李振宇

Expression of human mutT homologue 1 (hMTH1) and its clinical significance in acute lymphoblastic leukemia Fan Guoqin, Chen Lili, Zhang Zhiyao, Yan Zhiling, Chen Chong, Li Depeng, Xu Kailin, Li Zhenyu

Corresponding author: Li Zhenyu, Department of Hematology, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China. Email: lizhenyumd@163.com

hMTH1 (human mutT homologue 1) 是 nudix 水解酶家族的成员之一,能有效水解核苷酸池中氧化的 dGTP、GTP、dATP 和 ATP,阻止这些氧化核苷酸插入 DNA 或者 RNA 中^[1]。这种水解反应保证了氧化核苷酸不再被 DNA 聚合酶识别,从而阻止了 DNA 氧化损伤。hMTH1 在多种肿瘤组织中高表达, Borrego 等^[2] 研究显示胃腺癌组织中 hMTH1 mRNA 表达水平明显增高。另外,胰腺癌和非小细胞肺癌中 hMTH1 mRNA 水平也明显升高^[3-4]。越来越多的研究表明, hMTH1 与肿瘤的发生、发展有密切关系,而 hMTH1 在血液系统恶性肿瘤中的研究甚少,我们通过检测 hMTH1 在急性淋巴细胞白血病(ALL)患者中的表达,结合临床资料,探讨 hMTH1 在 ALL 发生、发展中的作用及潜在的临床意义。

病例和方法

1. 研究对象:以 2013 年 1 月至 2014 年 7 月我院收治的 31 例初诊 ALL 患者为研究对象,所有患者均经骨髓细胞学、免疫分型、分子生物学及细胞遗传学检查明确诊断为 ALL。31 例 ALL 患者中男 17 例、女 14 例,中位年龄 30 岁。以 21 名健康体检者为正常对照,其中男 13 名,女 8 名,中位年龄 28 岁。本研究获得本院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

2. 治疗及疗效判定:诱导治疗:Ph 阴性 ALL (Ph⁻ ALL) 患者采用 VDCLP 方案:长春新碱(VCR)1.4 mg/m²,第 1、8、15、22 天;柔红霉素(DNR)40 mg/m²,第 1~3、15~16 天;环磷酰胺(CTX)750 mg/m²,第 1、15 天;培门冬酶 2 500 IU/m²,第 10、24 天;泼尼松 1 mg·kg⁻¹·d⁻¹,第 15 天起逐渐减量至第 28 天停药。Ph 阳性 ALL (Ph⁺ ALL) 患者在 VDCLP 方案第 15

天加用伊马替尼 400 mg/d,若粒细胞缺乏,尤其是中性粒细胞绝对值<0.2×10⁹/L 持续时间超过 1 周,出现感染、发热等并发症,暂时停用伊马替尼。第 1 个疗程 ALL 患者治疗反应按照中国成人 ALL 诊断与治疗专家共识^[5]分为完全缓解(CR)、CR 伴血细胞不完全恢复(CRi)、难治性疾病、疾病进展(PD)、疾病复发,其中 CR 21 例,未缓解(难治性疾病及 PD)10 例;随访过程中复发 7 例。

3. 实时定量 PCR 检测 ALL 患者治疗前后 hMTH1 mRNA 的表达水平:收集 ALL 患者骨髓标本行 Ficoll 密度梯度离心法分离单个核细胞,冻存于-80℃冰箱备用。采用 Invitrogen 公司的 TRIzol 试剂抽提标本的 RNA,根据各样本 RNA 浓度按照逆转录试剂盒说明操作,将 mRNA 逆转录成 cDNA。引物序列:hMTH1 上游引物 5'-AGGTGGGCCA-GATCGTGTGG-3',下游引物 5'-TCGTCGGGCCACAT-GTCC-3'; GAPDH 上游引物 5'-CATCAAGAAGGTGGT-GAAGCAG-3',下游引物 5'-CAAAGGTGGAGGAGT-GGGTG-3'。采用瑞士罗氏公司 LightCycler® 480 实时定量 PCR 系统进行 PCR,反应条件:95℃预变性 30 s,95℃变性 15 s,60℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,40 个循环。根据 2^{-ΔΔCt} 计算 hMTH1 mRNA 相对表达量。GAPDH 为内参照。

4. Western blot 法检测 hMTH1 蛋白表达水平:分别取上述单个核细胞提取蛋白并测定其浓度,取等量蛋白常规法行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳后转至硝酸纤维素(NC)膜,封闭液室温下封闭 2 h,加入兔抗人 hMTH1 抗体(美国 Novus Biologicals 公司产品)、鼠抗人 GAPDH 抗体(美国 Bioworld 公司产品)(1:1 000),一抗常温孵育 1 h,PBST 缓冲液洗膜 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(山羊抗兔:美国 Bioworld 公司产品;山羊抗鼠:美国 Santa Cruz Biotechnology 公司产品)常温孵育 1 h,PBST 缓冲液洗膜 3 次,采用 ECL 试剂盒(美国 Bio-Rad 公司产品)进行发光显色。

5. 统计学处理:采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差表示,两样本均数间的比较采用独立样本 t 检验,多样本均数间的比较采用单因素方差分析,多个样本均数间的两两比较采用 q 检验,多个实验组与一个对照组均数间的两两比较采用 Dunnett 检验;相关分析采用 Pearson 相关分析方法。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、ALL 初诊患者 hMTH1 mRNA 表达水平

ALL 初诊患者的 hMTH1 mRNA 表达水平为 1.91±0.79,明显高于正常对照组的 0.71±0.45,差异有统计学意义(P<

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.06.017

基金项目:江苏省科技厅临床医学科技专项项目(SBL201330199)

作者单位:221002 徐州医学院附属医院血液科

通信作者:李振宇,Email:lizhenyumd@163.com

0.05)。

1. 不同亚型 ALL 初诊患者 hMTH1 mRNA 表达水平: B-ALL 患者(21 例)与 T-ALL 患者(10 例)hMTH1 mRNA 的表达水平分别为 1.99 ± 0.67 和 1.76 ± 1.01 , 均高于正常对照组, 差异均有统计学意义(P 值均 < 0.05); 而 B-ALL 与 T-ALL 患者之间 hMTH1 mRNA 的表达水平差异无统计学意义($P = 0.370$)。Ph⁺ ALL 患者(5 例)与 Ph⁻ ALL 患者(26 例)hMTH1 mRNA 表达水平分别为 1.92 ± 0.83 和 1.89 ± 0.62 , 均高于正常对照组, 差异均有统计学意义(P 值均 < 0.05), 而 Ph⁺ ALL 患者与 Ph⁻ ALL 患者之间 hMTH1 mRNA 表达水平差异无统计学意义($P = 0.744$)。

2. 不同疗效 ALL 患者初诊时 hMTH1 mRNA 表达水平: 31 例患者中第 1 个疗程诱导治疗后达 CR 者 21 例; 未缓解患者 10 例。CR 组 ALL 患者初诊时 hMTH1 mRNA 表达水平为 1.84 ± 0.93 , 低于未缓解组的 2.04 ± 0.59 , 但差异无统计学意义($P = 0.662$)。

二、ALL 患者治疗前、后 hMTH1 mRNA 表达水平变化

第 1 个疗程诱导治疗后 CR 患者 hMTH1 mRNA 表达水平(0.55 ± 0.42)较治疗前明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 与正常对照组相比差异无统计学意义($P = 0.990$); 未缓解患者 hMTH1 mRNA 表达水平(1.61 ± 0.37)与治疗前相比差异无统计学意义($P = 0.442$), 明显高于 CR 患者及正常对照组(P 值均 < 0.05); 随访过程中复发患者 hMTH1 mRNA 表达水平(2.01 ± 0.32)升高, 高于初诊患者, 但差异无统计学意义($P = 0.448$), 明显高于 CR 患者及正常对照组($P < 0.05$)。

三、ALL 患者 hMTH1 mRNA 表达水平与临床资料的相关性

ALL 患者 hMTH1 mRNA 表达水平与患者血小板计数呈负相关($r = -0.389$, $P = 0.045$), 与患者白蛋白水平及骨髓原始淋巴细胞比例呈正相关(r 值分别为 0.338 和 0.335, P 值分别为 0.047 和 0.040); 与患者的性别、年龄、白细胞计数、血红蛋白含量、LDH 水平及染色体核型无相关性(P 值均 > 0.05)。

四、ALL 患者 hMTH1 mRNA 表达水平与白血病细胞免疫表型的关系

1. B-ALL: 对 B-ALL 患者 hMTH1 mRNA 表达水平与 CD19、CyCD79a、HLA-DR、CD13、CD10、CD33、CD34、CyCD22、CD20、TdT 表达的关系进行分析, 结果显示, B-ALL 患者 hMTH1 mRNA 表达水平与 HLA-DR、TdT 表达呈正相关(r 值分别为 0.613 和 1.000, P 值分别为 0.003 和 0.000), 与 CD19、CD13、CD10、CD33、CyCD79a、CD34、CD20、CyCD22 的表达无相关性(P 值均 > 0.05)。

2. T-ALL: 对 T-ALL 患者 hMTH1 mRNA 表达水平与 CD5、CD7、CD2、CD3、CyCD3、CD34、CD13 表达的关系进行分析, 结果显示, T-ALL 患者 hMTH1 mRNA 表达水平与 CD7 表达呈正相关($r = 0.786$, $P = 0.036$), 与 CD5、CD2、CD3、CD34、CD13 表达无相关性(P 值均 > 0.05)。

3. 髓系抗原表达的 ALL (My⁺ ALL) 患者 hMTH1

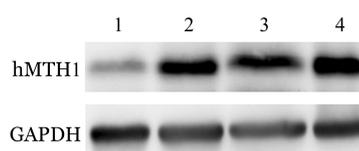
mRNA 表达水平: 31 例 ALL 患者中 My⁺ ALL 21 例, My⁻ ALL 10 例, 两者的 hMTH1 mRNA 表达水平分别为 1.98 ± 1.08 和 1.88 ± 0.63 , 差异无统计学意义($P = 0.765$)。

五、ALL 患者 hMTH1 mRNA 表达水平与预后的关系

根据中国成人 ALL 诊断与治疗专家共识^[5]对 ALL 患者进行预后分组, 标危组 6 例, 高危组 25 例, hMTH1 mRNA 表达水平分别为 1.84 ± 0.70 和 2.19 ± 1.12 , 两组间差异无统计学意义($P = 0.858$)。

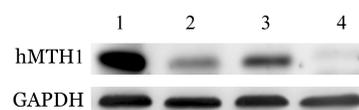
六、ALL 患者 hMTH1 蛋白表达水平

1. ALL 初诊患者 hMTH1 蛋白表达水平: Ph⁻ B-ALL、Ph⁺ B-ALL 及 T-ALL 初诊患者 hMTH1 蛋白表达水平分别为 1.28 ± 0.19 、 1.15 ± 0.14 、 1.33 ± 1.00 , 较正常对照组(0.47 ± 0.21)升高, 差异均有统计学意义(P 值均 < 0.05) (图 1)。

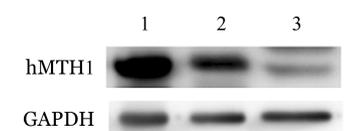


1: 正常对照; 2: Ph⁻ B-ALL 患者; 3: Ph⁺ B-ALL 患者; 4: T-ALL 患者
图 1 Western blot 法检测急性淋巴细胞白血病(ALL)初诊患者 hMTH1 蛋白表达

2. ALL 患者治疗前、后 hMTH1 蛋白表达水平变化: ALL 患者治疗后达 CR 者 hMTH1 蛋白表达水平(0.44 ± 0.08)较治疗前下降, 差异有统计学意义($P = 0.008$); 复发后 hMTH1 蛋白表达水平(0.92 ± 0.30)又升高, 与 CR 期及正常对照组比较差异均有统计学意义(P 值均为 0.001) (图 2); 治疗后未缓解患者 hMTH1 蛋白表达水平(1.21 ± 0.28)仍高于正常对照组($P < 0.05$) (图 3)。



1: 治疗前; 2: 完全缓解后; 3: 复发后; 4: 正常对照
图 2 Western blot 法检测急性淋巴细胞白血病完全缓解患者治疗前后 hMTH1 蛋白表达



1: 治疗前; 2: 治疗后; 3: 正常对照
图 3 Western blot 法检测急性淋巴细胞白血病未缓解患者治疗前后 hMTH1 蛋白表达

讨 论

hMTH1 是 DNA 氧化损伤修复中重要的酶, 能水解核苷酸池中氧化的脱氧核糖核苷酸(dNTPs), 可将 8-oxo-dGTP 和 2-OH-dATP 分别转化为 8-oxo-dGMP 和 2-OH-dAMP, 防止 DNA 复制过程中氧化的核苷酸整合到 DNA 中, 避免 DNA

氧化损伤。在多种肿瘤中,包括脑癌^[6]、乳腺癌^[7]、肺癌^[8]、胃癌^[2]和肾癌^[9]等瘤组织的hMTH1 mRNA水平比相应的正常组织增高。

在本研究中,我们检测了 ALL 患者 hMTH1 mRNA 表达水平,结果显示初诊 ALL 患者 hMTH1 mRNA 表达水平明显高于正常对照组,第 1 疗程诱导治疗后 CR 患者 hMTH1 mRNA 表达水平下降到接近正常人水平,未缓解患者 hMTH1 mRNA 表达水平仍较高,复发患者 hMTH1 mRNA 表达水平增高。癌细胞具有与正常细胞不一样的代谢特点,通过研究癌细胞和正常细胞之间代谢的不同,选择性地靶向癌细胞特异的代谢机制,为癌症治疗开辟了新的途径,如替换佐米靶向肿瘤中增高的蛋白酶体活性^[10];Chk1 和 ATR 激酶抑制剂通过增加肿瘤细胞的 DNA 损伤来达到抗癌治疗的目的^[11]。Gad 等^[12]以及 Huber 等^[13]发现 hMTH1 在癌细胞中是必需的,但非正常细胞所必需;对 hMTH1 的抑制会导致癌细胞 DNA 损伤和细胞死亡,而对正常细胞影响较小,提出 hMTH1 可以作为肿瘤治疗的一个靶点。我们的研究结果显示不管是初诊 ALL 患者还是难治复发性 ALL 患者中 hMTH1 表达水平均明显增高,提示 hMTH1 有望成为 ALL 治疗的靶点。

我们进一步分析了 hMTH1 mRNA 表达水平与 ALL 患者临床资料的相关性。在白血病免疫表型中,B-ALL 患者 hMTH1 mRNA 表达水平与 HLA-DR、TdT 表达强度呈正相关。T-ALL 患者 hMTH1 mRNA 表达水平与 CD7 表达强度呈正相关。HLA-DR 为造血细胞早期分化阶段的表面分化抗原,有利于区别白血病细胞的分化程度;TdT 在白血病免疫分型中有广泛应用,还可以作为缓解过程中监测复发的手段^[14];CD7 是 T 细胞分化中最早出现的标志,在 T 细胞发育的早期阶段高水平表达,因此,hMTH1 可能和白血病细胞的原始程度相关,甚至可以作为监测病情的指标。值得注意的是,Ph⁺ ALL 患者与 Ph⁻ ALL 患者 hMTH1 mRNA 水平差异无统计学意义,而且,hMTH1 mRNA 表达水平与患者的染色体核型无关,与 Gad 等^[12]的研究一致。一些染色体异常与肿瘤患者的不良预后相关^[15],而 hMTH1 表达水平和肿瘤中的遗传变异没有相关性,本研究中难治复发 ALL 患者的 hMTH1 mRNA 表达水平仍较高。因此,对于难治复发的 ALL 患者,hMTH1 不失为一个新的治疗靶点。目前已有研制出 hMTH1 抑制剂的报道^[12-13],因此进一步明确 hMTH1 在 ALL 中的作用机制,可能为 hMTH1 抑制剂能够用于 ALL 患者的治疗奠定基础。

我们的研究显示 hMTH1 mRNA 表达水平与 ALL 患者的白蛋白水平呈正相关,提示 hMTH1 mRNA 表达水平可能也受患者机体营养状态的影响。另外,本研究中 B-ALL 与 T-ALL 患者之间、Ph⁺ ALL 患者与 Ph⁻ ALL 患者之间 hMTH1 mRNA 的表达水平差异无统计学意义,标危组和高危组患者的 hMTH1 mRNA 表达水平差异亦无统计学意义,可能由于病例数较少,仍需要扩大病例数进一步明确。

综上所述,hMTH1 在 ALL 患者中高表达,可能与 ALL

患者的白血病细胞的原始程度相关,对于监测病情可能有辅助价值。尤为重要,是,hMTH1 有望作为 ALL 患者的治疗靶点,特别是难治复发性患者的治疗靶点。

参考文献

- [1] Nakabeppu Y, Oka S, Sheng Z, et al. Programmed cell death triggered by nucleotide pool damage and its prevention by MutT homolog-1 (MTH1) with oxidized purine nucleoside triphosphatase[J]. *Mutat Res*, 2010, 703(1): 51-58.
- [2] Borrego S, Vazquez A, Dasí F, et al. Oxidative Stress and DNA Damage in Human Gastric Carcinoma: 8-Oxo-7'-8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) as a Possible Tumor Marker [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(2): 3467-3486.
- [3] Buchholz M, Braun M, Heidenblut A, et al. Transcriptome analysis of microdissected pancreatic intraepithelial neoplastic lesions[J]. *Oncogene*, 2005, 24(44): 6626-6636.
- [4] Patel A, Burton DG, Halvorsen K, et al. MutT Homolog 1 (MTH1) maintains multiple KRAS-driven pro-malignant pathways [J/OL]. *Oncogene*, 2014-07-14 [2014-09-20]. <http://www.nature.com/ncurrent/full/ncurrent2014195a.html>.
- [5] 中华医学会血液学分会,中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会.中国成人急性淋巴细胞白血病诊断与治疗专家共识[J].*中华血液学杂志*, 2012, 33(9): 789-792.
- [6] Iida T, Furuta A, Kawashima M, et al. Accumulation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and increased expression of hMTH1 protein in brain tumors[J]. *Neuro Oncol*, 2001, 3(2): 73-81.
- [7] Wani G, Milo GE, D'Ambrosio SM. Enhanced expression of the 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanosine triphosphatase gene in human breast tumor cells[J]. *Cancer Lett*, 1998, 125(1/2): 123-130.
- [8] Kennedy CH, Pass HI, Mitchell JB. Expression of human MutT homologue (hMTH1) protein in primary non-small-cell lung carcinomas and histologically normal surrounding tissue [J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 34(11): 1447-1457.
- [9] Okamoto K, Toyokuni S, Kim WJ, et al. Overexpression of human mutT homologue gene messenger RNA in renal-cell carcinoma: evidence of persistent oxidative stress in cancer[J]. *Int J Cancer*, 1996, 65(4): 437-441.
- [10] Roccaro AM, Hideshima T, Richardson PG, et al. Bortezomib as an antitumor agent[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2006, 7(6): 441-448.
- [11] Toledo LI, Murga M, Fernandez-Capetillo O. Targeting ATR and Chk1 kinases for cancer treatment: a new model for new (and old) drugs[J]. *Mol Oncol*, 2011, 5(4): 368-373.
- [12] Gad H, Koolmeister T, Jemth AS, et al. MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool[J]. *Nature*, 2014, 508(7495): 215-221.
- [13] Huber KV, Salah E, Radic B, et al. Stereospecific targeting of MTH1 by (S)-crizotinib as an anticancer strategy [J]. *Nature*, 2014, 508(7495): 222-227.
- [14] 张之南,郝玉书,赵永强,等. *血液病学*[M]. 2版.北京:人民卫生出版社,2011:964-975.
- [15] Alvarnas JC, Brown PA, Aoun P, et al. Acute lymphoblastic leukemia[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2012, 10(7): 858-914.

(收稿日期:2014-11-17)

(本文编辑:王叶青)