

O-GlcNAc糖基化对Nalm-6细胞生物学行为及依托泊苷诱导凋亡的影响

张冰 李栋 时庆 鞠秀丽

【摘要】 目的 研究O连接的N-乙酰葡萄糖胺(O-GlcNAc)糖基化及乙酰氨基葡萄糖转移酶(OGT)对Nalm-6细胞生物学行为及对依托泊苷(Vp16)诱导凋亡的影响。方法 利用OGT抑制剂Alloxan构建低O-GlcNAc修饰的Nalm-6细胞模型,CCK-8法检测Alloxan对细胞增殖的影响,流式细胞术检测Alloxan对细胞凋亡及细胞周期的影响;以不同浓度的Vp16处理Nalm-6细胞12 h,Western blot检测O-GlcNAc糖基化修饰程度及OGT表达量的变化;以Alloxan处理Nalm-6细胞24 h后再加入Vp16(5 μg/ml)处理12 h,应用流式细胞术检测不同组别细胞凋亡,Western blot检测凋亡相关蛋白Bax和Bcl-2的表达情况。结果 随着Vp16浓度的增加,Nalm-6细胞O-GlcNAc修饰及OGT表达均逐渐上调($P<0.05$);Alloxan可抑制Nalm-6细胞增殖,诱发Nalm-6细胞凋亡[(15.190±2.539)%对(21.910±4.105)% , $P=0.007$] ,阻滞细胞周期[G₁期:(43.534±4.453)%对(57.322±6.091)% , $P=0.003$; S期:(50.747±5.937)%对(37.201±4.661)% , $P=0.001$] ;Alloxan可抑制Vp16诱导的Nalm-6细胞凋亡[(75.195±13.845)%对(52.741±10.815)% , $P=0.011$] ,并伴随Bax表达下调(5.496±1.998对2.950±0.703, $P=0.015$)、Bcl-2表达上调(0.454±0.125对0.803±0.223, $P=0.013$)。结论 通过抑制OGT而改变Nalm-6细胞O-GlcNAc修饰程度可影响其增殖、凋亡、改变细胞周期并抑制Vp16诱导的细胞凋亡。

【关键词】 Nalm-6细胞; O-GlcNAc; 乙酰氨基葡萄糖转移酶; 依托泊苷; 糖基化

基金项目: 山东省科技攻关计划(2014GSF118131); 深圳市科技研发资金知识创新计划(JCYJ2014041811544917)

O-GlcNAc glycosylation influences the biological behaviors and etoposide - induced apoptosis of Nalm-6 cells Zhang Bing, Li Dong, Shi Qing, Ju Xiuli^{*}. *Department of Pediatrics, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China*

Corresponding author: Ju Xiuli, Email: Shellysdcn@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of O-GlcNAc glycosylation and its key enzyme OGT on the biological behaviors and etoposide (Vp16) - induced apoptosis of Nalm-6 cells. **Methods** Low O-GlcNAc modified Nalm-6 cells model was established with Alloxan, an inhibitor of OGT. The influence of Alloxan on Nalm-6 cells proliferation was checked by CCK-8 assay, apoptosis and cell cycle by flow cytometry. Nalm-6 cells were treated with different concentrations of Vp16 for 12 h, and then the O-GlcNAc level and the expressions of OGT were examined by Western blot. After treating Nalm-6 with Alloxan for 24 h and then 5 μg/ml of Vp16 for 12 h, the apoptosis of different groups were measured with flow cytometry, and the expression of apoptosis-associated proteins Bax and Bcl-2 were examined by Western blot. **Results** With the concentration of Vp16 increasing, the O-GlcNAc modified levels of total protein and the expression of OGT were up regulated ($P<0.05$, $n=6$); Alloxan could slow down the proliferation capacity, induce apoptosis[(15.190±2.539)% vs (21.910±4.105)% , $P=0.007$] , arrest cell cycle [G₁ phase: (43.534±4.453)% vs (57.322±6.091)% , $P=0.003$; S phase: (50.747±5.937)% vs (37.201±4.661)% , $P=0.001$]. Alloxan could inhibit the apoptosis caused by Vp16 [(75.195±13.845)% vs (52.741±10.815)% , $P=0.011$] along with Bax decreasing (5.496±1.998 vs 2.950±0.703, $P=0.015$) and Bcl-2 increasing (0.454±0.125 vs 0.803±0.223, $P=0.013$). **Conclusion** Changes of O-GlcNAc modified level of Nalm-6 cells along with the inhibition of OGT could influence the biological behaviors and inhibit apoptosis induced by Vp16.

【Key words】 Nalm-6 cells; O-linked N-acetylglucosamine; β -N-acetylglucosaminyltransferase; Etoposide; Glycosylation

Fund program: Shandong Provincial Technology R&D Project (2014GSF118131); Shenzhen S&T Research Funding Innovation Project (JCYJ2014041811544917)

O连接的N-乙酰葡萄糖胺(O-GlcNAc)糖基化是由 Zachara 和 Hart 首次发现的一种重要的蛋白质翻译后修饰^[1]。O-GlcNAc糖基化是一个动态可逆的过程,由乙酰氨基葡萄糖转移酶(OGT)负责糖基化,N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(OGA)负责去糖基化。在生物体内,O-GlcNAc糖基化控制基本的生命过程,例如蛋白质的合成、染色质的结构、DNA脱甲基化以及生物昼夜规律。AKT^[2]等信号蛋白以及c-Myc^[3]、p53^[4]、NF- κ B^[5]等转录因子都存在O-GlcNAc糖基化修饰。近年来,大量研究证实O-GlcNAc糖基化蛋白在乳腺癌^[6]、前列腺癌^[7]、膀胱癌^[8]等多种肿瘤中发挥重要作用,但并没有在急性B淋巴细胞白血病(B-ALL)以及其耐药方面中进行相关研究。本研究选用B-ALL细胞株Nalm-6细胞作为主要研究对象,从糖生物学角度分析O-GlcNAc糖基化及相关酶OGT在B-ALL发展及对依托泊苷(Vp16)诱导凋亡方面的作用,并初步探讨其作用机制。

材料与方 法

1. 主要试剂和仪器:胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司;RPMI 1640培养基购自美国Hyclone公司;CCK-8细胞增殖和细胞毒性检测试剂盒购自日本同仁公司;四氧嘧啶(Alloxan)、Vp16为江苏恒瑞医药公司产品;鼠源 β -actin、Bax、兔源Bcl-2一抗均购于美国Proteintech公司;鼠源O-GlcNAc糖基化特异性抗体RL2、兔源OGT一抗购自美国Abcam公司;山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物公司;细胞周期和凋亡检测试剂盒、Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)细胞凋亡试剂盒购自美国BD公司;Guava easy-Cyte8H流式细胞仪购自美国EMD Millipore公司;C-Digit化学发光仪购自美国LI-COR公司。

2. 细胞培养:Nalm-6细胞株为山东大学齐鲁医院低温实验室保存,用含10%FBS的RPMI 1640培养基(含100 U/ml青霉素/链霉素),在37℃、5%CO₂饱和湿度条件下培养,2~3 d换液1次。取对数生长期细胞进行实验。

3. Western blot法检测OGT、O-GlcNAc糖基化及凋亡相关蛋白水平:将Nalm-6细胞接种于6孔板

中,分别加入终浓度为0、5和10 mmol/L的Alloxan,作用24 h后收集细胞,PBS缓冲液洗2遍以去除残留的培养基,每个样品加入100 μ l细胞裂解液提取总蛋白。BCA法测定蛋白浓度。取适量蛋白进行SDS-PAGE,转印至聚偏二氟乙烯膜(PVDF),室温于TBST缓冲液溶解的50 g/L脱脂奶粉中封闭1 h,用TBST缓冲液洗膜3次,加入RL2、OGT一抗后室温摇床孵育1 h,再置于4℃冰箱中孵育过夜,用TBST缓冲液洗膜3次,于相应的二抗室温孵育1 h,用TBST缓冲液洗膜3次,将膜置于C-Digit化学发光仪曝光显影。同法检测不同浓度的Vp16处理后O-GlcNAc水平变化以及Alloxan联合Vp16作用后凋亡相关基因Bax、Bcl-2在蛋白水平的变化。

4. CCK-8法检测细胞增殖:取对数生长期的Nalm-6细胞,分为Alloxan处理组和对照组,同时设置空白组(不加细胞)。将细胞种于96孔板中(每孔100 μ l,细胞密度为 5×10^5 /ml),每组设置3个复孔。Alloxan处理组加入Alloxan(终浓度10 mmol/L),分别于加药培养后0、1、2、3、4 d加入CCK-8检测试剂(每孔10 μ l),在37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养2 h,肉眼观察染色情况,然后用酶标仪检测450 nm处吸光度(A)值。结果以相对吸光度值表示。

5. 流式细胞术检测细胞周期:分为对照组和Alloxan处理组。将Nalm-6细胞接种于12孔板中(每孔1 ml,细胞密度为 4×10^5 /ml),Alloxan处理组加入Alloxan(终浓度5 mmol/L),对照组加入等量无菌水,置于培养箱中继续培养24 h,收集细胞,用预冷的PBS缓冲液洗2遍,加入75%乙醇固定过夜,第2天用预冷的PBS缓冲液洗涤细胞,每个样本加入500 μ l PI染色液,避光孵育15 min,上机检测细胞周期。

6. 流式细胞术检测细胞凋亡:先向Nalm-6细胞中加入Alloxan(终浓度5 mmol/L),对照组加入等量无菌水,作用24 h后加入Vp16(终浓度5 μ g/ml),12 h后收集各组细胞,倒置显微镜下进行细胞计数。每组取 1×10^6 个细胞,用PBS洗2遍,300 \times g离心5 min后弃上清,用100 μ l 1 \times Annexin V结合液重悬细胞,加入PI和FITC标记的Annexin V各

5 μl, 室温避光孵育 20 min, 再加入 1×Annexin V 结合液 100 μl, 混匀后上机检测。

7. 统计学处理:应用 SPSS 19.0 进行数据分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用单因素方差分析进行多组间数据比较, 用 *t* 检验进行两组间数据比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. Western blot 检测 Alloxan 对 Nalm-6 细胞 OGT 表达及 O-GlcNAc 糖基化水平的影响: 以不同浓度的 Alloxan 处理细胞 24 h 后, Nalm-6 细胞 OGT 表达以及 O-GlcNAc 糖基化程度逐渐降低 (P < 0.05), 并且有一定的剂量依赖性。Alloxan 浓度为 10 mmol/L 时, O-GlcNAc 降低最为明显, 可以此浓度构建低 O-GlcNAc 细胞模型。详见图 1。

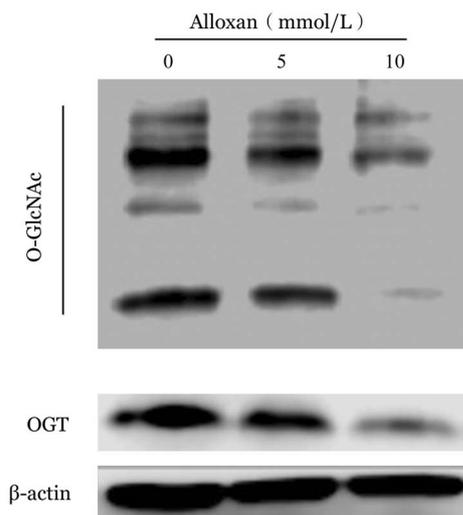


图 1 Western blot 检测不同浓度四氧嘧啶 (Alloxan) 对 Nalm-6 细胞乙酰氨基葡萄糖转移酶 (OGT) 表达和 O-GlcNAc 糖基化的影响 (P < 0.05, n=6)

2. Western blot 检测 Vp16 对 Nalm-6 细胞 OGT 表达及 O-GlcNAc 糖基化水平的影响: 随着 Vp16 浓度的增加, Nalm-6 细胞内 OGT 表达量逐渐增加。在低浓度 Vp16 组, 细胞总蛋白 O-GlcNAc 糖基化程度变化不明显, 当 Vp16 浓度达到 1 μg/ml 时, O-GlcNAc 糖基化程度明显增高 (P < 0.05, n=6)。详

见图 2。

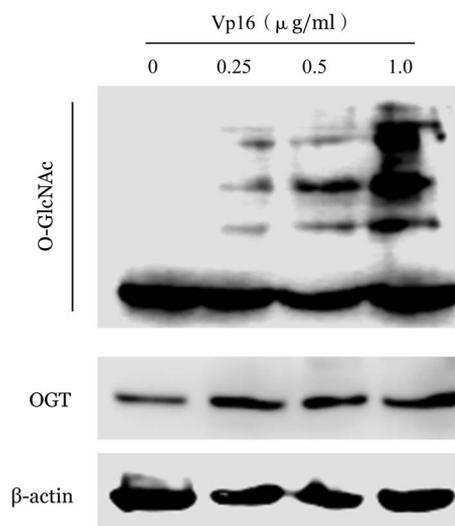


图 2 依托泊苷 (Vp16) 对 Nalm-6 细胞乙酰氨基葡萄糖转移酶 (OGT) 表达和 O-GlcNAc 糖基化水平的影响 (P < 0.05, n=6)

3. CCK-8 法检测 Alloxan 对 Nalm-6 细胞增殖、凋亡影响: 以 10 mmol/L Alloxan 作用于 Nalm-6 细胞后, 连续 4 d 进行 CCK-8 法检测。结果表明, 在 Alloxan 处理第 1 天时, 细胞增殖已经受到明显抑制 (P=0.022), 随着药物作用时间延长, Alloxan 仍能显著抑制细胞增殖 (P < 0.001) (表 1)。以 10 mmol/L Alloxan 处理 Nalm-6 细胞 24 h 后, Alloxan 组细胞的凋亡率为 (21.910±4.105)%, 而对照组 (未处理) 凋亡率仅为 (15.190±2.539)%, 差异有统计学意义 (P=0.007) (图 3)。

4. 流式细胞术检测 Alloxan 对 Nalm-6 细胞周期的影响: 10 mmol/L Alloxan 处理 Nalm-6 细胞 48 h 后, 对照组 G₁ 期细胞比例为 (43.534±4.453)%, S 期细胞比例为 (50.747±5.937)%; Alloxan 处理组 G₁ 期 Nalm-6 细胞比例高于未用 Alloxan 处理的对照组 (t=3.827, P=0.003), S 期细胞比例高于对照组 (t=4.396, P=0.001), G₂ 期细胞比例两组差异无统计学意义 (t=1.928, P=0.083), 详见表 2、图 4。上述结果表明, Alloxan 可将 Nalm-6 细胞周期阻滞于 G₁ 期, 减少进入 S 期的细胞比例。

表 1 CCK-8 法检测四氧嘧啶 (Alloxan) 对 Nalm-6 细胞增殖的影响 (相对吸光度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	1 d	2 d	3 d	4 d
对照组	6	1.421±0.186	1.949±0.322	2.602±0.259	2.862±0.229
Alloxan 组	6	1.179±0.114	1.236±0.116	1.880±0.233	2.023±0.297
<i>t</i> 值		2.717	5.124	5.062	5.479
<i>P</i> 值		0.022	< 0.001	< 0.001	< 0.001

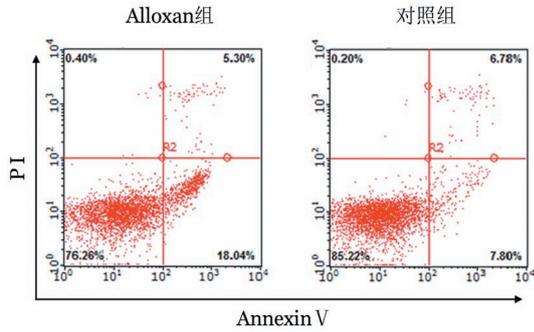
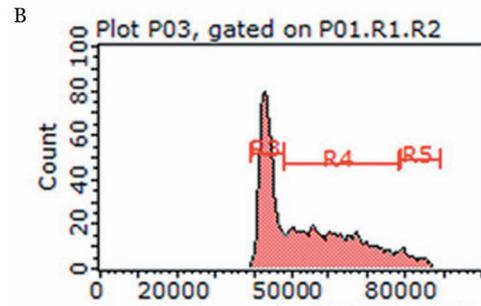
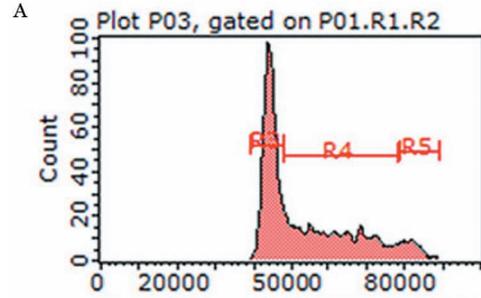


图3 流式细胞术检测四氧嘧啶(Alloxan)对Nalm-6细胞凋亡的影响

4. Alloxan对Vp16诱导Nalm-6细胞凋亡的影响: 10 mmol/L Alloxan处理后的Nalm-6细胞经5 μg/ml Vp16作用12 h,流式细胞术检测显示细胞凋亡率低于未处理组[(52.741 ± 10.815)%对(75.195 ± 13.845)% , $t=3.146, P=0.011$](图5A), Western blot检测显示促凋亡蛋白Bax蛋白表达下调(5.496 ± 1.998对2.950 ± 0.703, $t=2.944, P=0.015$)、抗凋亡蛋白Bcl-2蛋白表达上调(0.454 ± 0.125对0.803 ± 0.223, $t=3.017, P=0.013$)(图5B)。

讨 论

细胞内能量代谢异常被认为是肿瘤细胞的典型特征^[9]。O-GlcNAc糖基化修饰过程的糖基供体为UDP-GlcNAc,该化合物是己糖胺合成途径



A: Alloxan组; B: 对照组

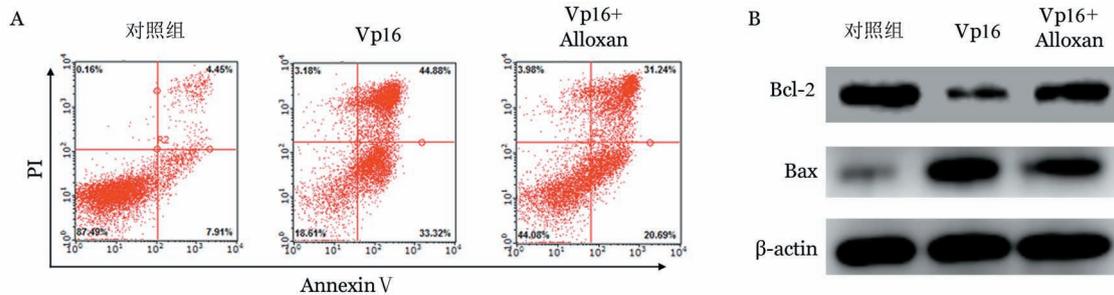
图4 流式细胞术检测四氧嘧啶(Alloxan)对Nalm-6细胞周期的影响

(HBP)的终产物,在生物体中约有3%~5%的葡萄糖进入HBP途径^[10]。近年来研究证实,在多种实体肿瘤中都存在O-GlcNAc修饰以及关键酶的异常^[11]。

早在2002年, Konrad等^[12]就提出了Alloxan是OGT的特异性抑制剂。在后续研究中,该理论得到了Lee等^[13]、Gurel等^[14]研究结果的证实。Xu等^[15]

表2 四氧嘧啶(Alloxan)对Nalm-6细胞周期的影响(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	细胞周期		
		G ₁ 期	S期	G ₂ 期
对照组	6	43.534 ± 4.453	50.747 ± 5.937	5.361 ± 0.728
Alloxan组	6	57.322 ± 6.091	37.201 ± 4.661	4.933 ± 0.675
<i>t</i> 值		3.827	4.396	1.928
<i>P</i> 值		0.003	0.001	0.083



A: 流式细胞术检测 Alloxan作用前后Vp16所致Nalm-6细胞凋亡; B: Western blot检测 Alloxan对Vp16诱导Nalm-6细胞Bcl-2、Bax蛋白表达的影响

图5 四氧嘧啶(Alloxan)对依托泊苷(Vp16)诱导Nalm-6细胞凋亡的影响

研究发现在高糖及氧化损伤的视网膜细胞存在蛋白的O-GlcNAc糖基化程度增高,在用Alloxan干预后其O-GlcNAc糖基化修饰水平下降,并且可减少高糖以及高氧环境对细胞的损伤。本研究采用Nalm-6细胞作为研究对象,证明了Alloxan能够降低细胞的O-GlcNAc修饰水平,可以用来构建低O-GlcNAc修饰的细胞模型。

Kim等^[16]发现在宫颈癌细胞中存在O-GlcNAc修饰的异常,其中异常修饰的宿主细胞因子HCF-1可影响人乳头瘤病毒(HPV)的E6以及E7癌基因蛋白的表达并影响宫颈癌的发生发展;用siRNA干扰OGT表达可以明显降低E6以及E7蛋白的表达,细胞的增殖、侵袭、转移也被显著抑制。本研究应用OGT抑制剂Alloxan作用于Nalm-6细胞,证明Alloxan可以明显抑制Nalm-6细胞的增殖并诱发细胞凋亡。

Vp16是作用于细胞周期的特异性抗肿瘤药物,其作用靶点为DNA拓扑异构酶II,影响DNA修复。本研究结果表明,Vp16作用于Nalm-6细胞可导致总蛋白O-GlcNAc修饰程度增加并伴随着OGT表达上调。那么Vp16为何会上调OGT表达?研究表明Vp16在杀伤细胞的同时可以影响细胞内的糖代谢。Demel等^[17]曾研究发现Vp16可以增加糖代谢相关蛋白葡萄糖转运蛋白-1(Glut1)和己糖激酶2(HKII)的表达,并且,Ferrer等^[18]证实OGT和Glut1的关系也非常密切,该文献中指出Glut1在OGT调控代谢方面有至关重要的作用,所以,笔者推测,当Vp16处理Nalm-6细胞后可能导致Glut1表达升高,进而导致糖代谢改变从而上调OGT的表达以及O-GlcNAc糖基化程度。

Stacey等^[19]应用时差显微成像技术研究证明Vp16对处于S期到G₂期的细胞的杀伤作用是G₁期的2~3倍。可见,Vp16对细胞的杀伤作用与处于分裂期的细胞比例密切相关。近年来,研究证实抑制OGT的活性可以阻断cyclin D1蛋白的合成以及细胞增殖,并降低细胞周期相关蛋白PI3K和MAPK蛋白的表达。在本研究中,Alloxan抑制Nalm-6细胞OGT活性后,G₁期细胞比例增多,S期细胞比例减少,而更重要的是,Alloxan可明显减少Vp16所致的Nalm-6细胞凋亡,同时伴随着促凋亡蛋白Bax表达上调和抑凋亡蛋白Bcl-2表达下调,推测该现象可能与Alloxan改变细胞周期从而减少了Vp16药物有效作用的细胞比例并进一步调节凋亡相关蛋白Bax及Bcl-2相关。

参考文献

- [1] Zachara NE, Hart GW. The emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation [J]. *Chem Rev*, 2002, 102 (2):431-438. DOI: 10.1021/cr000406u.
- [2] Shi J, Wu S, Dai CL, et al. Diverse regulation of AKT and GSK-3 β by O-GlcNAcylation in various types of cells [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586 (16):2443-2450. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.05.063.
- [3] Itkonen HM, Gorad SS, Duveau DY, et al. Inhibition of O-GlcNAc transferase activity reprograms prostate cancer cell metabolism [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (11):12464-12476. DOI: 10.18632/oncotarget.7039.
- [4] Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T, et al. O-GlcNAcylation: a new cancer hallmark? [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013, 4:99. DOI: 10.3389/fendo.2013.0009.
- [5] Ma Z, Vocadlo DJ, Vosseller K. Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF- κ B activity in pancreatic cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(21):15121-15130. DOI: 10.1074/jbc.M113.470047.
- [6] Chaiyawat P, Netsirisawan P, Svasti J, et al. Aberrant O-GlcNAcylated proteins: new perspectives in breast and colorectal cancer [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014, 5:193. DOI: 10.3389/fendo.2014.00193.
- [7] Kamigaito T, Okaneya T, Kawakubo M, et al. Overexpression of O-GlcNAc by prostate cancer cells is significantly associated with poor prognosis of patients [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2014, 17(1):18-22. DOI: 10.1038/pcan.2013.56.
- [8] Rozanski W, Krzeslak A, Forma E, et al. Prediction of bladder cancer based on urinary content of MGEA5 and OGT mRNA level [J]. *Clin Lab*, 2012, 58(5-6):579-583.
- [9] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5):646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [10] Ferrer CM, Sodi VL, Reginato MJ. O-GlcNAcylation in Cancer Biology: Linking Metabolism and Signaling [J]. *J Mol Biol*, 2016, 428(16):3282-3294.
- [11] Jozwiak P, Forma E, Brys M, et al. O-GlcNAcylation and Metabolic Reprogramming in Cancer [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014, 5:145.
- [12] Konrad RJ, Zhang F, Hale JE, et al. Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293(1):207-212. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)00200-0.
- [13] Lee TN, Alborn WE, Knierman MD, et al. Alloxan is an inhibitor of O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 350(4):1038-1043. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.09.155.
- [14] Gurel Z, Zaro BW, Pratt MR, et al. Identification of O-GlcNAc modification targets in mouse retinal pericytes: implication of p53 in pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):e95561. DOI: 10.1371/journal.pone.0095561.
- [15] Xu C, Liu G, Liu X, et al. O-GlcNAcylation under hypoxic conditions and its effects on the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(3):624-632. DOI: 10.3892/ijmm.2013.1597.
- [16] Kim M, Kim YS, Kim H, et al. O-linked N-acetylglucosamine transferase promotes cervical cancer tumorigenesis through human papillomaviruses E6 and E7 oncogenes [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28):44596-44607. DOI: 10.18632/oncotarget.10112.

[17] Demel HR, Feurecker B, Piontek G, et al. Effects of topoisomerase inhibitors that induce DNA damage response on glucose metabolism and PI3K/Akt/mTOR signaling in multiple myeloma cells[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(5):1649-1664.

[18] Ferrer CM, Lynch TP, Sodi VL, et al. O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway[J]. *Mol Cell*, 2014, 54(5):820-831. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.04.026.

[19] Stacey DW, Hitomi M, Chen G. Influence of cell cycle and

oncogene activity upon topoisomerase IIalpha expression and drug toxicity[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(24):9127-9137.

[20] Olivier-Van Stichelen S, Drougat L, Dehennaut V, et al. Serum-stimulated cell cycle entry promotes ncOGT synthesis required for cyclin D expression [J]. *Oncogenesis*, 2012, 1:e36. DOI: 10.1038/oncsis.2012.36.

(收稿日期:2016-08-01)

(本文编辑:徐茂强)

·病例报告·

M₂型急性髓系白血病患者治疗后 再发急性淋巴细胞白血病一例

马鸣 焦文静 刘永春 王丽虹 张金艳

A case of AML-M₂ accompanied with ALL transformation after treatment Ma Ming, Jiao Wenjing, Liu Yongchun, Wang Lihong, Zhang Jinyan
 Corresponding author: Zhang Jinyan, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China. Email: jinyanzhang@163.com

患者,女性,14岁。因“咽喉肿痛、血常规白细胞分类异常、外周血涂片发现幼稚粒细胞”于2014年6月9日来我院儿科就诊。患者神志清楚、精神好、无发热、咳嗽。查体:无皮疹、出血,右侧扁桃体Ⅲ度肿大,左侧扁桃体Ⅱ度肿大,咽充血、口腔黏膜光滑、完整,双肺未闻及干、湿啰音,肝、脾及浅表淋巴结均未触及,既往无血液病病史。血常规:WBC 7.97×10⁹/L,中性粒细胞占0.341,单核细胞占0.465,淋巴细胞占0.181, HGB 101.3 g/L,PLT 91×10⁹/L,分类可见原始、幼稚粒细胞,偶见 Auer 小体。LDH 392.7U/L、α-羟丁酸(HBDH) 322.1 U/L、ADA 29.0 mmol/L、ALP 184.8 U/L。骨髓象:增生极度活跃,粒系异常增生,以原始粒细胞为主,占0.760,可见 Auer 小体,红、巨两系明显受抑,成熟红细胞大小不等,血小板少见,原始细胞过氧化酶(POX)染色呈阳性。流式细胞术检测结果:65%原始细胞群体, MPO、HLA-DR、CD33、CD38 及 CD11b 均呈阳性表达, CD3、CD13、CD4、CD34、CD8、CD14、CD20、CD22、CD7、CD117、CD61、CD41、CD79a、CD19 及 CD56 均呈阴性表达。染色体核型分析:46, XX, del(9)(q21)[18]/46, idem, del(X)(q21)[3]。FLT3-ITD 突变阴性。WT1 基因拷贝数为 122(正常参考值<140), AML1-ETO、PLZF-RARα、CBFβ-MYH11 及 PML-RARα 均呈

阴性表达;诊断为急性髓系白血病(AML)-M_{2a}。给予 DAE 方案(盐酸柔红霉素、阿糖胞苷、依托泊苷)化疗,骨髓缓解后,常规维持用药1年,至今停药1年2个月,期间11次骨髓穿刺检查,均显示缓解。

2016年8月14日,患者因化脓性扁桃体炎再次就诊。查体:体温39℃,无皮疹、出血,双侧扁桃体Ⅲ度肿大、咽充血,双肺未闻及干、湿啰音,肝、脾及浅表淋巴结未触及。血常规:WBC 6.64×10⁹/L,中性粒细胞占0.273,单核细胞占0.136,淋巴细胞占0.577, HGB 105.5 g/L, PLT 37×10⁹/L,外周血原始细胞占0.120。LDH 589.0 U/L、HBDH 471 U/L。骨髓象:有核细胞增生明显活跃,原始细胞占0.850,该类细胞核型较规则、染色质稍粗、核仁隐显不一,胞质量较少、染蓝色、可见紫红色颗粒(图1);红系仅见少量幼红细胞,成熟红细胞大小不一;巨核细胞2个,血小板少见;POX染色呈阴性;PAS染色呈颗粒状阳性。流式细胞术检测结果:68%异常细胞群体, CD79a、CD19、HLA-DR、TdT 及 CD38 均呈阳性表达,部分细胞表达 CD15、CD22 及 CD34, cIgM、CD3、CD117、CD33、CD13、MPO、CD56 及 CD10 均呈阴性表达,诊断为急性淋巴细胞白血病(Pro-B-ALL可能)。此次患者就诊未进行基因及染色体检查,目前仍在治疗中。

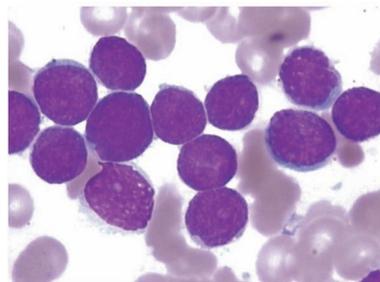


图1 本次就诊骨髓原始细胞(×1 000)

(收稿日期:2016-08-19)

(本文编辑:王叶青)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.03.013

作者单位:050011 石家庄,河北医科大学第四医院检验科

通信作者:张金艳,Email:jinyanzhang@163.com