

急性白血病凋亡基因及细胞 DNA 检测的临床意义

李岩¹ 刘秀兰¹ 张铎² 毕可红¹ 徐从高²

R733.71

【摘要】 目的:研究急性白血病促、抑凋亡基因表达、白血病细胞 DNA 含量及三指标间相关性。方法:用流式细胞术检测 51 例急性白血病及 20 例良性血液患者 CD₉₅、bcl-2 表达率、白血病细胞 DNA 含量。结果:急性白血病 CD₉₅ 表达率降低且与完全缓解率无关。bcl-2 表达率、白血病细胞 DNA 异倍体率增高且化疗后完全缓解率低。CD₉₅、bcl-2、白血病细胞 DNA 指数(DI)间无相关性,三指标表达均异常相关性分析,CD₉₅与 bcl-2 呈负相关, $r = -0.8011, P < 0.05$, CD₉₅与 DI 无相关性 $r = 0.5012, P > 0.05$, bcl-2 与 DI 呈正相关, $r = 0.7902, P < 0.05$ 。结论:急性白血病 CD₉₅、bcl-2 表达率,白血病细胞 DNA 检测可进一步研究急性白血病发病机制,指导临床合理用药及预测预后。

【关键词】 白血病/急性;白血病/基因;CD₉₅;bcl-2;DNA 含量

中图分类号:R733.3;R330.231

文献标识码:A

文章编号:1009-4571(2000)01-0037-03

The Significance of apoptic gene, the DNA content of the cells in acute Leukemias. Li Yan, Liu Xiu-lan, ZHANG Ti, et al. Shandong Qianfoshan Hospital, Jinan 250014

【Abstract】 Objective: To investigate the expression of promotive and inhibitory apoptotic genes, the DNA content of the cells and their interrelationship in acute leukemias. **Methods:** Flowcytometric analysis of CD₉₅, bcl-2 and the DNA content of the cells was performed in 51 patients with acute leukemias and 20 non-malignant controls. **Results:** The expression rate of CD₉₅ was decreased and didn't relate to CR rate. The expression rate of bcl-2 and the DNA abnormal cells was increased, and there was a inverse relation to CR rate. There wasn't correlated among the expression rate of CD₉₅, bcl-2 and DI(DNA index). But in the patient with three abnormal in dexes, CD₉₅ bcl-2 and DI, CD₉₅ and bcl-2 was inverse correlation, $r = -0.8011, P < 0.05$, CD₉₅ and DI was not correlation, $r = 0.5012, P > 0.05$, bcl-2 and DI was correlation, $r = 0.7902, P < 0.05$. **Conclusions:** Measurements of CD₉₅, bcl-2 expression rate and the DNA content of the cells might put some insight into the pathogenesis of acute leukemia and be helpful in clinical management of these disease.

【Key words】 leukemias/acute; leukemias/genes; CD₉₅; bcl-2; DNA

急性白血病是危害人类健康的常见恶性肿瘤之一,其发病机制的研究是目前许多学者关注的热点,本研究检测急性白血病患者促凋亡基因(CD₉₅)、抑制凋亡基因(bcl-2)表达,白血病细胞 DNA 含量,分析各指标相关性及其与化疗疗效的关系,旨在进一步探讨急性白血病细胞生物学特性。

1 材料与方法

1.1 病例及化疗方案的选择

1998年1月~1999年3月在我院及山东医科

大学附属医院住院病人 51 例,男 28 例,女 23 例,年龄 12~71 岁,平均年龄 35.62 岁,根据临床表现,周围血象、骨髓细胞学检查确诊,按 FAB 分型标准,分为初治组 28 例(A 组)、难治/复发组 12 例(B 组)、完全缓解组 11 例(C 组)。18 例急性淋巴细胞白血病(ALL) A 组采用 VCDP 方案(长春新碱、环磷酰胺、柔红霉素、泼尼松)化疗;33 例急性非淋巴细胞白血病 A 组采用 DA(柔红霉素、阿糖胞苷)、HA(三尖杉酯碱、阿糖胞苷)或 HAD 方案化疗;急性白血病 B 组用 VM₂₆A(威猛、阿糖胞苷)治疗。M₃ 采用全反式维甲酸(ATRA)或联合小剂量化疗,疗效标准参照张之南主编《血液病诊断及疗效标准》^[1],同时检测 20 例良性血液病患者骨髓为对照组,其中缺铁性贫血 12 例,特发性血小板减少性紫癜 8 例。

作者单位:

1 济南市(250014) 山东省千佛山医院

2 济南市(250012) 山东医科大学附属医院

1.2 方法

取受检者空腹静脉血 5 ml(周围血象幼稚细胞 > 60%)或骨髓。肝素抗凝(50 u/ml), 4 000 rpm 离心 5 min, 用淋巴细胞分层液获取单个核细胞, 分别加入 CD₉₅-FITC(Pharmingen 公司产品)、bcl-2-FITC(Ancell 公司产品)荧光标记抗体及 PI 染液(Sigma 公司产品), 大鼠 IgG₁-FITC 及正常人淋巴细胞做外参, 流式细胞仪为美国 B-D 公司高档机型 FACS Vantage。流式细胞术(FCM)能多参数、快速、定性、定量测定群体细胞中单个细胞的生物过程。

1.3 结果判定

对照组 CD₉₅表达率为 55.12% ± 6.77%, 低于 48.45% 为 CD₉₅表达阳性; bcl-2 表达率为 38.94%

± 5.60%, 高于 44.54% 为 bcl-2 表达阳性; DI 正常值为 0.9~1.10, < 0.90 为亚二倍体, > 1.10 为超二倍体, 二者均为非整倍体。

1.4 统计方法

计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间行 *t* 检验及直线相关分析, 计数资料组间行 χ^2 检验, *P* < 0.05 为显著差异。

2 结果

急性白血病 CD₉₅、bcl-2 表达率、CD₉₅、bcl-2 表达与化疗疗效关系、DI、DNA 非整倍体及 SP 分布及急性白血病 A 组 DI、DNA 非整倍体率及 SP 分布与化疗疗效关系分别见表 1~ 表 4。

表 1 急性白血病 CD₉₅、bcl-2 表达率

组别	例数	CD ₉₅ 表达率	<i>P</i> 值	bcl-2 表达率	<i>P</i> 值
A	28	34.14% ± 6.46%	> 0.05	42.00% ± 4.33%	< 0.01
B	12	33.71% ± 6.17%	> 0.05	68.36% ± 7.81%	< 0.01
C	11	35.62% ± 7.15%	< 0.05	36.29% ± 3.83%	< 0.05
对照	20	55.12% ± 8.77%		21.05% ± 4.10%	

表 2 急性白血病 CD₉₅、bcl-2 表达与化疗疗效关系

组别	例数	CD ₉₅ (+) CR(%)	CD ₉₅ (-) CR(%)	<i>P</i> 值	bcl-2(+) CR(%)	bcl-2(-) CR(%)	<i>P</i> 值
A	28	56.25	58.33	> 0.05	40.00	69.23	< 0.01
B	12	22.22	33.33	> 0.05	12.25	25.00	< 0.05

表 3 急性白血病 DI、DNA 非整倍体及 SP 分布

组别	例数	DI	<i>P</i> 值	DNA 非整倍体(%)	<i>P</i> 值	SP	<i>P</i> 值
A	8	1.13 ± 0.19	< 0.05	42.86	< 0.05	5.60 ± 7.31	
B	12	1.22 ± 0.16	< 0.05	83.33	< 0.05	5.23 ± 3.12	< 0.01
C	11	1.03 ± 0.10		18.18		0	

表4 急性白血病A组DI、DNA非整倍体率及SP分布与化疗疗效关系

组别	例数	DI	P值	DNA非整倍体(%)	P值	SP	P值
A组CR者	15	1.06 ± 0.08	< 0.05	26.67	< 0.05	5.36 ± 7.41	< 0.05
A组非CR者	13	1.21 ± 0.24		61.54		5.87 ± 7.45	

CD₉₅、bcl-2、DI间(r_1)及A、B、C各组表达均阳性者间(r_2)相关性分析。CD₉₅与bcl-2: $r_1 = -0.415, P > 0.05; r_2 = -0.801, P < 0.05$ 。CD₉₅与DI: $r_1 = 0.410, P > 0.05; r_2 = 0.410, P > 0.05$ 。CD₉₅与DI: $r_1 = 0.391, P > 0.05; r_2 = 0.790, P < 0.05$ 。

3 讨论

急性白血病发病机制之一为细胞凋亡异常,1970年Kerr描述凋亡现象,认为细胞死亡与增殖不平衡是多种疾病的根源^[2]。Fas基因为促凋亡基因,以膜受体的形式存在,表达于各种正常组织和肿瘤细胞,1993年第五届人类白细胞分化抗原国际会议将Fas抗原作为CD₉₅归于CD之中,bcl-2基因促进细胞生存,延长细胞寿命,保持细胞数不减。生物中DNA含量比较稳定,可随细胞周期各时相发生变化,G₀、G₁期细胞为二倍体,G₂、M期细胞为四倍体,S期细胞介于二者之间;细胞发生恶变时,DNA含量可能成为非整倍体,此为肿瘤细胞的特征。本研究通过检测急性白血病CD₉₅、bcl-2表达率,白血病细胞DNA含量测定,发现急性白血病CD₉₅表达率降低,与陈燕等^[3]检测结果一致。急性白血病组间CD₉₅表达率无差异,CD₉₅表达阳性及阴性的A、B组正规化疗后CR率无差异,提示CD₉₅表达与缓解率无关。Karaka等^[4]检测219例急性白血病84.00% bcl-2表达率增高,本研究示急性白血病各组bcl-2表达率均高于正常,且B组明显高于A、C组,bcl-2表达阳性及阴性的A、B组正规化疗后CR率差异显著,示bcl-2高表达者CR率低。Bincoletto等^[5]也报道bcl-2高表达者对化疗不敏感,影响预后。Kihara等^[6]用FCM分析急性白血病细胞凋亡前蓄积于G₀/G₁期,且光镜下未找到白血病细胞时FCM也可发现9%的非整倍体,说明FCM可发现体

内存在的低于光镜检测水平的残留白血病细胞。本研究显示,急性白血病A、B组DI、DNA非整倍体率、SP均高于C组,随着患者达CR,三项指标均显著下降,但仍有部分CR患者存在DNA非整倍体。CD₉₅、bcl-2、DI间直线相关关系,与Pallis等^[7]报道一致。曹惠芳等^[8]观察bcl-2基因可部分拮抗Fas介导的细胞凋亡,CD₉₅、bcl-2、DI各指标均异常的二指标间相关性分析,bcl-2与CD₉₅、DI间有相关性。但因本组病例进一步分组后观察例数较少,相关性分析有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 张之楠.血液病诊断及疗效标准[M].天津:天津科学技术出版社,1991,89-95.
- [2] 陈姗姗.用流式细胞术研究血液病细胞死亡生物学[J].中国实验血液学杂志,1998,6(2):81-84.
- [3] 陈燕,周剑峰,乐蓓蓓,等. Bcl-2基因及其家族Bax、Bcl-XL和Fas/Apo1、P16的检测在急性白血病中的临床意义[J].癌症,1998,17(5):352-355.
- [4] Karakas T, Maurer U, Weidmann E, et al. High expression of bcl-2 mRNA as a determinant of poor prognosis in acute myeloid leukemia[J]. Ann Oncol, 1998, 9(2): 159-165.
- [5] Bincoletto C, Sang ST, da Silva ES, et al. Haematopoietic response and bcl-2 expression in patients with acute myeloid leukemia[J]. Eur J Haematol, 1999, 62(1): 38-42.
- [6] Kihara Negishi F, Yamada T, Kubota Y, et al. Downregulation of c-myc and bcl-2 gene expression induced apoptosis in murine erythroleukemia cells[J]. Int J Cancer, 1998, 76(4): 523-530.
- [7] Pallis M, Zhu YM, Russell NH, et al. Bcl-XL is heterogeneously expressed by acute myel-oblatic leukemia cells and is associated with autonomous growth in vitro and P-glycoprotein expression [J]. Leukemia, 1997, 11(7): 945-948.
- [8] 曹惠芳,钱其军,吴孟超,等. bcl-2基因转染阻断Fas介导的Jurkat细胞凋亡[J].中华血液学杂志,1998,19(5):244-246.

收稿日期:1999-12-23 修回期:2000-02-15

(编辑:左文述 校对:钟伟)