

自噬基因 Atg5 和 MAPLC3 在急性白血病中的表达及其意义

李龙平 周勇军 王新华 全壮志

作者单位: 413000 益阳市, 中南大学湘雅医学院益阳临床学院

【摘要】 目的 探讨急性白血病(acute leukemia, AL)骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells, BMMNC)中自噬基因 Atg5 和 MAPLC3 的表达及其临床意义。**方法** 采用荧光定量逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 150 例 AL 患者和 30 例正常人 BMMNC 中 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 的表达水平, 对检测结果进行统计学分析。**结果** 与对照组相比, 急性髓系白血病(acute myelogenous leukemia, AML)各危险度组的 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 表达水平均明显降低, 且差异均有统计学意义(P 均 <0.01), 从低危组、中危组至高危组, 其 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 表达水平逐步降低, 组间两两比较, 差异均有统计学意义(P 均 <0.01); 与对照组相比, 急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)各危险度组 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 的表达水平均明显增高, 差异均有统计学意义(P 均 <0.01), 高危组患者的 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 表达水平明显低于标危组, 差异均有统计学意义(P 均 <0.01); 对照组和 AL 患者 BMMNC 中 Atg5 mRNA 水平与 MAPLC3 均呈显著正相关(P 均 <0.01)。**结论** 自噬基因 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 在 AL 中均有表达, 且其表达水平呈正相关。AML 患者的自噬活性明显降低, 而 ALL 患者的自噬活性明显增高, 随着危险度的增高, 两种类型白血病自噬活性均呈明显下降趋势。

【关键词】 急性白血病; 自噬; Atg5 基因; MAPLC3 基因; 荧光定量逆转录-聚合酶链反应

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2014.03.006

Expression and clinical significance of autophagy associated gene Atg5 and MAPLC3 in bone marrow mononuclear cells in patients with acute leukemia

LI Long-ping, ZHOU Yong-jun, WANG Xin-hua, et al. Yiyang Clinical Institute of Xiangya Medical College in Central South University, Yiyang 413000, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression and clinical significance of autophagy associated gene Atg5 and MAPLC3 in bone marrow mononuclear cells (BMMNC) in patients with acute leukemia (AL). **Methods** Fluorescent quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was employed to detect Atg5 and MAPLC3 mRNA expression levels in BMMNC of 150 cases AL patients and 30 cases of healthy normals. The results were analyzed statistically. **Results** Compared with the control group, the Atg5 and MAPLC3 mRNA levels in all the risk groups of acute myelogenous leukemia (AML) were significantly reduced, and the differences all had statistical significance (P all <0.01). From the low-risk group, risk group to the high-risk group, the Atg5 and MAPLC3 mRNA levels gradually decreased, and the differences between each two groups all had statistical significance (P all <0.01); Compared with the control group, the Atg5 and MAPLC3 mRNA levels in all the risk groups of acute lymphoblastic leukemia (ALL) were significantly increased, and the differences all had statistical significance (P all <0.01). Atg5 and MAPLC3 mRNA levels in patients with high-risk group was significantly lower than that of standard risk group, the differences all had statistical significance (P all <0.01); The Atg5 mRNA levels was positively related to the MAPLC3 levels in BMMNC of the control group and AL patients (P all <0.01). **Conclusion** The autophagy associated gene Atg5 and MAPLC3 are all expressed, and show positive correlation in AL patients. The autophagic activity in patients with AML is significantly reduced, while in patients with ALL is significantly increased. With increasing risk of both types of leukemia autophagic activity show a significantly decreased trend.

【Key words】 Acute leukemia; Autophagy; Atg5 gene; MAPLC3 gene; Reverse transcription-polymerase chain reaction

急性白血病(acute leukemia, AL)是一组造血干 细胞异常的克隆性恶性疾病, 是国内常见的高发恶

性肿瘤之一。其发病机制尚未完全阐明,目前多认为与病毒、某些化学物质、放射因素和分子遗传学异常等有关。自噬是以胞质内形成双层膜结构自噬体为特征的细胞自我降解的一系列生物学过程。自噬对肿瘤细胞具有抑制和促进的双重调节作用,参与了肿瘤的发生和发展,业已成为国际上肿瘤研究的热点^[1]。因此,深入研究细胞自噬和肿瘤之间的关系有助于阐明肿瘤的分子病理机制和寻找靶向于自噬分子机制的抗肿瘤药物,为分子水平的肿瘤治疗提供新思路,具有重要的临床价值。本文研究采用荧光定量逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 150 例 AL 患者和 30 例正常人骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear, BMMNC)中 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 的表达水平,旨在进一步探讨自噬基因 Atg5 和 MAPLC3 在 AL 中的表达及相互关系,以期对 AL 的诊疗和新药研发提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2011 年 10 月-2013 年 10 月来我院就诊的 AL 患者 150 例。所有入选对象均参照并结合 WHO 与 FAB 分型标准进行诊断分型。其中男 90 例,女 60 例,年龄 22~69 岁,平均年龄(38.6±14.5)岁。其中急性髓系白血病(acute myelogenous leukemia, AML)共 90 例,包括 M1 型 6 例, M2 型 38 例, M4 型 27 例, M5 型 10 例, M6 型 9 例;急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)共 60 例,其中 B-ALL 54 例, T-ALL 6 例。收集 30 例自愿捐献骨髓的正常人骨髓标本作为对照组。综合 2011 年版成人 AML 中国诊疗指南^[2]和中国成人 ALL 诊断与治疗专家共识^[3]将 AML 患者分为低危组 30 例、中危组 30 例和高危组 30 例,而将 ALL 患者分标危组 30 例和高危组 30 例。

1.2 方法

1.2.1 标本制备 采集受试者 4 ml 新鲜骨髓加入肝素抗凝管中,按 1:4 的比例加入不含血清的 RPMI1640 培养液,混匀。在离心管中加入适量淋巴细胞分离液后,用吸管吸取骨髓稀释液缓慢加于分层液面上,注意保持清楚的界面。以离心半径 15 cm, 2000 r/min 离心 15 min。用毛细血管插到中间白膜层,吸取单个核细胞放入另一离心管,加入 5 倍以上体积的 RPMI1640,以离心半径 15 cm, 1500 r/min 离心 15 min,洗涤细胞两次。末次离心后弃上清,取底层细胞吸入 EP 管中放入离心机,以离心半径 15 cm, 3000 r/min 离心 5 min。再次弃上清,提取

细胞总 RNA。

1.2.2 RT-PCR 检测 BMMNC 中 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 的表达水平 按照试剂盒操作说明书的说明合成 cDNA 备用。Atg5: 上游引物为 5'-GGCCATCAATCGGAAACTCAT-3';下游引物为 5'-CAGC-CACAGGACGAAACAGC-3';扩增产物长度为 123 bp。MAPLC3: 上游引物为 5'-GAA-GATGTCCGACTTATTCGAGAG-3';下游引物为 5'-ACTCTCATACACCTCTGAGATTGG-3';扩增产物长度为 352 bp。内参照 GAPDH: 上游引物为 5'-TCGGAGGTCAACGGAT-TTGTTGTA-3';下游引物为 5'-TGGCATGGACTGTGGTCATGAGTC-3';扩增产物长度为 525 bp。扩增条件为:94℃预变性 5 min,然后 94℃变性 40 s,55℃退火 40 s,72℃延伸 40 s,共计 29 个循环,最后 72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物在 1%琼脂糖凝胶中电泳,采用凝胶成像仪观察并照相。结果以阳性条带与 GAPDH 光密度比值作为阳性条带的相对表达值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间计量资料的比较采用方差分析,AL 患者 BMMNC 中 Atg5 与 MAPLC3 mRNA 表达的相关性分析采用 Spearman 相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AML 各组和对照组 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 表达水平的比较 与对照组相比,AML 各危险度组的 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 表达水平均明显降低,且差异均有统计学意义(P 均 < 0.01),从低危组、中危组至高危组,其 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 表达水平逐步降低,组间两两比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.01),见表 1。

表 1 AML 各组和对照组 Atg5、MAPLC3 mRNA 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Atg5	MAPLC3
对照组	30	0.664±0.058	0.166±0.056
低危组	30	0.526±0.034*	0.145±0.042*
中危组	30	0.421±0.048* ^Δ	0.126±0.038* ^Δ
高危组	30	0.325±0.051* ^Δ [▲]	0.108±0.034* ^Δ [▲]
F 值	-	12.358	16.127
P 值	-	< 0.01	< 0.01

注: *与对照组比较, $P < 0.01$; ^Δ与低危组比较, $P < 0.01$; [▲]与中危组比较, $P < 0.01$

2.2 ALL 各组和对照组 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 表

达水平的比较 与对照组比较, ALL 各危险度组的 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 表达水平均明显增高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 高危组患者的 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 表达水平明显低于标危组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 ALL 各组和对对照组 Atg5、MAPLC3 mRNA 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Atg5	MAPLC3
对照组	30	0.664±0.058	0.166±0.056
标危组	30	4.312±0.076*	1.545±0.064*
高危组	30	0.785±0.042*▲	0.199±0.045*▲
F 值	—	21.345	18.224
P 值	—	< 0.01	< 0.01

注: *与对照组比较, $P < 0.01$; ▲与标危组比较, $P < 0.01$ 。

2.3 AL 患者 BMMNC 中 Atg5 与 MAPLC3 mRNA 表达水平的相关性 对照组 BMMNC 中 Atg5 与 MAPLC3 mRNA 表达水平呈显著正相关 ($r = 0.923$, $P < 0.01$), AML 组 BMMNC 中 Atg5 与 MAPLC3 mRNA 表达水平呈显著正相关 ($r = 0.886$, $P < 0.01$), ALL 组 BMMNC 中 Atg5 与 MAPLC3 mRNA 表达水平呈显著正相关 ($r = 0.835$, $P < 0.01$)。

3 讨论

自噬基因 Atg5 是一种参与自噬体形成的特异性基因, 具有调控自噬体形成和抑制肿瘤生成等多种生物学作用。在自噬体形成过程中, Atg5 可与 Atg12 形成 Atg5-Atg12 泛素样连接系统, 然后与 Atg16 形成 Atg12-Atg5-Atg16 多聚复合体, 最后与外膜结合, 促进自噬体膜结构的伸展扩张并最终形成自噬体。自噬基因 MAPLC3 是一种定位于自噬泡内膜并与酵母 Atg8 基因同源的自噬体特异性标志物, 可加工修饰自噬相关泛素样蛋白, 参与多种信号传导调节。只有膜结合形式的 LC3-II 才能定位于自噬泡膜上并不脱落, 其水平的高低与自噬泡数量呈正相关, 一定程度上可直接反映细胞自噬的程度。此外, LC3-II 配体 p62 也是细胞内信号传导的一个整合性蛋白, 其是否被降解也可以作为细胞自噬发生与否的一个良好的标志物^[4]。自噬活性的变化可从肿瘤细胞凋亡、血管生成及抗肿瘤治疗等多个层面影响肿瘤进程^[5], 参与了肿瘤的发生和发展。万保罗等^[6]研究发现, LC3 在喉癌组织中的阳性表达率明显低于癌旁及声带息肉组织, 并与肿瘤部位和病理学分级密切相关。李婉丽等^[7]研究证实, 儿童 ALL 外周血有核细胞中自噬基因 Beclin-1 的表达低于正常人外周血有核细胞。胡晓燕等^[8]的研究结果显示,

初治 AL 患者 BMMNC 中自噬相关基因 MAPLC3 mRNA 的表达均上调, 尤其是难治愈发者, 认为可能与 AL 的发生、发展及其耐药相关。白海等^[9]采用透射电镜检测自噬在不同疾病状态 AL 患者 BMMNC 中的形态学改变, 结果显示, 初发和复发难治 AL 患者骨髓细胞中的自噬泡比例明显增高, 并随着病情缓解, 患者细胞阳性数减少。本文研究结果显示, 与对照组相比, AML 各危险度组的 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 表达水平均明显降低, 表明 AML 患者的自噬活性明显低于正常人群。本文研究结果还显示, AML 患者的不同危险度分组中, 从低危组、中危组至高危组, 其 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 表达水平逐步降低, 表明随着危险度级别的增加, AML 患者的自噬基因 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 表达水平呈明显下降趋势, 提示自噬基因 Atg5 和 MAPLC3 的表达水平与 AML 患者的危险度密切相关, 其表达水平越低, 其危险度越高。因此, 检测 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 表达水平有助于评估 AML 患者的危险度, 评估其预后。本文研究结果显示, 与对照组相比, ALL 各危险度组的 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 表达水平均明显增高, 表明 ALL 患者的自噬活性呈高表达。本文研究结果还显示, ALL 高危组患者的 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 表达水平明显低于标危组, 表明随着危险度级别的增加, ALL 患者的自噬基因 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 表达水平呈明显下降趋势, 提示自噬基因 Atg5 和 MAPLC3 的表达水平一定程度上可反映 ALL 的危险度高低, 其表达水平越低, 其危险度越高。因此, 检测 Atg5 和 MAPLC3 mRNA 表达水平有助于评估 ALL 患者的危险度, 有利于治疗方案的选择和预后判断。本文研究结果还显示, 对照组和 AL 患者 BMMNC 中 Atg5 mRNA 表达水平与 MAPLC3 均呈显著正相关, 表明 BMMNC 中 Atg5 mRNA 表达水平与 MAPLC3 密切相关, 可能共同参与自噬体形成的调控。

综上所述, AML 患者的自噬活性明显降低, 而 ALL 患者的自噬活性明显增高, 随着危险度的增高, 两种类型白血病自噬活性均呈明显下降趋势。提示不同的细胞类型自噬的功能明显不同。因此通过检测自噬基因 Atg5 和 MAPLC3 的表达水平有助于评估自噬在不同肿瘤和同一肿瘤的不同发展阶段所起的作用, 继而有利于治疗方案的选择。

4 参考文献

- 杜海磊, 邱伟华, 杨卫平. 细胞自噬与肿瘤. 中国病理生理杂志, 2010, 26: 401-404.

- 2 中华医学会血液学分会. 成人急性髓系白血病 (非急性早幼粒细胞白血病) 中国诊疗指南 (2011 年版). 中华血液学杂志, 2011, 32: 804-807.
- 3 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. 中华血液学杂志, 2012, 33: 789-792.
- 4 王宠, 张萍, 朱卫国. 细胞自噬与肿瘤发生的关系. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26: 988-997.
- 5 李国东, 吴德全, 李本义. 细胞自噬在肿瘤中作用的研究进展. 癌症, 2009, 28: 445-448.
- 6 万保罗, 董俊华, 王琳, 等. 微管相关蛋白 1 轻链 3 在喉癌中的表达及其意义. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2011, 25: 497-500.
- 7 李婉丽, 杨惠军, 张本山, 等. 自噬基因 Beclin-1 在儿童急性淋巴细胞白血病细胞的表达. 中国误诊学杂志, 2011, 11: 3795-3797.
- 8 胡晓燕, 白海, 潘耀柱, 等. 自噬相关基因 Beclin1 和 MAPLC3 在急性白血病骨髓单个核细胞中的表达及其意义. 中国实验血液学杂志, 2011, 19: 598-601.
- 9 白海, 胡晓燕, 马晓慧, 等. 急性白血病患者骨髓单个核细胞自噬作用的超微结构观察. 西北国防医学杂志, 2012, 33: 104-106.

(收稿日期: 2014-07-14)

(本文编辑: 杨军)

消 息

第十三届亚洲运动医学大会会议通知

亚洲运动医学联合会是国际运动医学联合会下属的洲际组织, 成立于 1990 年, 学会旨在推动亚洲各国运动医学的合作与交流。亚洲运动医学大会是亚洲知名运动医学品牌学术大会, 也是亚洲运动医学领域最全面的国际学术盛会。大会为境内代表授予国家 I 类医学继续教育学分 8 分。

第十三届亚洲运动医学大会由亚洲运动医学联合会、中华医学会、中华医学会运动医疗分会、中国体育科学学会运动医学分会主办, 将于 2014 年 10 月 20 日-23 日在北京国家会议中心召开。大会期间, 还将召开亚洲运动医学联合会执委会、全体理事代表大会, 中华医学会运动医疗分会换届大会, 中国体育科学学会运动医学分会常委会等重要工作会议。

本次学术会议将邀请前主席 Freddie H Fu 教授、国际运动医学联合会主席 Fabio Pigozzi 教授、亚洲运动医学联合会主席 Mohammad Razi 教授等国际著名运动医学专家进行大会主题报告和专题学术讲座。为了充分展示我国运动医学学术成果, 请您积极报送论文报告。大会组委会将根据报告内容统筹安排各类学术交流。

1 大会学术交流形式

大会主题报告、专题口头报告、墙报交流、Workshop、运动医学专题讲座与课程、全国队医培训班 (通知另发)。

2 投稿须知

2.1 投稿专题 运动创伤、关节镜外科、关节置换、运动康复、运动队医疗与医务监督、运动生理生化、运动营养、运动与健康促进、中医药在运动医学领域中的应用、国际会场 (英文发言)、亚洲运动医学青年论坛 (英文发言)。

2.2 报送要求 请按要求报送中文或英文摘要。包括研究目的、对象与方法、结果 (须包括主要数据)、结论四个部分。要求未曾公开发表, 内容具有科学性、先进性; 网上投稿为唯一报送方式。请登录大会网站 www.casm.org.cn, 按照提示要求提交论文摘要; 截稿日期: 2014 年 6 月 15 日。

3 会议注册须知

注册费: 2014 年 8 月 1 日前 900 元; 8 月 1 日后 1100 元。

会前注册截止时间: 2014 年 9 月 15 日, 此后可到会场进行现场注册。

注册程序: 登陆网站 www.casm.org.cn, 在线填写注册信息; 会前注册费仅能通过网上支付, 秘书处收到注册表后对注册情况予以确认。参会时, 请持“注册确认函”到注册处报道, 领取会议资料。

4 会议时间及地点

会议地点: 国家会议中心

地 址: 北京市朝阳区天辰东路 7 号

会议日期: 2014 年 10 月 21 日-23 日

5 联系方式

国家体育总局运动医学研究所 (北京市体育馆路甲 2 号旁门)

中华医学会学术会务部 (北京市东四西大街 42 号)

电话: 010-67192756/67192751/85158146/13720005117

E-mail: AFSM2014@sohu.com

会议网址: www.casm.org.cn