

Combined Detection of MDR1 and BAALC Gene Expression in Intermediate Risk Group Acute Myeloid Leukemia Patients and Their Clinical Implication

Pengcheng Shi, Haiqing Zheng, Yan Wang, Suqi Deng, Leisi Zhang, Xutao Guo*

Department of Hematology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou Guangdong
Email: *gxt827@126.com

Received: Jul. 17th, 2017; accepted: Aug. 4th, 2017; published: Aug. 10th, 2017

Abstract

Objective: Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous disease, in terms of genetic/molecular abnormalities resulting into marked differences in outcome. We had demonstrated that *MDR1*, *BAALC* expression were of prognostic significance and high *MDR1* expression correlated with a high *BAALC* expression in intermediate-risk AML in the prophase study. We founded that *MDR1* and *BAALC* expression together would better identify the patient's risk profile. **Methods:** Pretreatment bone marrow samples from 105 adult intermediate risk group AML (IR-AML) patients were analyzed for *MDR1* and *BAALC* mRNA expression by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. Patients were divided into different groups according to *MDR1* and *BAALC* levels and were compared for clinical outcome. **Results:** 83 cases of 105 IR-AML patients got CR after the first block with a CR rate being 79.0%. However, 32 cases of the CR patients with IR-AML relapsed with the relapsed rate being 38.6%. On the basis of *MDR1* and *BAALC* expression status, we identified four different subgroups: low *MDR1*/low *BAALC* ($N = 35$), low *MDR1*/high *BAALC* ($N = 17$), high *MDR1*/low *BAALC* ($N = 17$), and high *MDR1*/high *BAALC* ($N = 36$). Patients with high expression of *MDR1* and/or *BAALC* were characterized by an inferior outcome with no significant differences between the three groups; thus, these patients were considered a single group. Patients with low *MDR1*/low *BAALC* had a superior CR rate (91.4% vs 72.9%, $P = 0.028$), OS (79.7% vs 25.3%, $P = 0.000$) and lower relapse rate 15.6% vs 52.9%, $P = 0.001$) than high *MDR1* and/or high *BAALC* expression in IR-AML. **Conclusion:** The combined assessment of *BAALC* and *MDR1* expression can improve treatment stratification in adult IR-AML. Low expression of both *MDR1* and *BAALC* identifies IR-AML patients with a favorable long-term outcome.

Keywords

Acute Myeloid Leukemia, MDR1, BAALC

*通讯作者。

联合检测中危组成人急性髓系白血病患者MDR1与BAALC基因mRNA表达水平及其临床意义

史鹏程, 郑海青, 王焱, 邓素琪, 张雷丝, 郭绪涛*

南方医科大学南方医院血液科, 广东 广州

Email: gxt827@126.com

收稿日期: 2017年7月17日; 录用日期: 2017年8月4日; 发布日期: 2017年8月10日

摘要

急性髓系白血病(Acute myeloid leukemia, AML)是高度异质性疾病,存在多种具有不同功能的临床意义的基因或分子学异常。我们已经证明了MDR1、BAALC基因均为AML重要的独立预后指标。但是联合检测这两个指标对于中危组AML预后的意义尚未进行阐述。方法:使用实时定量PCR方法检测105例初治成人中危组AML的骨髓标本中MDR1和BAALC基因mRNA水平。将AML患者根据两个基因表达水平分别分为高表达组和低表达组,并统计分析两组病例中临床预后间差异。结果:105例中危组AML中首次诱导化疗后CR率为79.0% (83/105),复发率为38.6% (32/83)。根据MDR1和BAALC基因表达情况,将105例患者分为4组。MDR1基因和BAALC基因均高表达组、MDR1基因高表达而BAALC基因低表达组、MDR1基因低表达而BAALC基因高表达组、MDR1基因和BAALC基因均低表达组。前三组间病人的一般情况及预后资料之间无统计学差异,因此将后组合并为一个组,即高MDR1和/或高BAALC基因表达组。低MDR1/低BAALC患者的CR率(91.4% vs 72.9%, $P = 0.028$)和OS (79.7% vs 25.3%, $P = 0.000$)明显高于高MDR1和/或高BAALC基因高表达组,而复发率明显低于MDR1和/或BAALC基因高表达组(15.6% vs 52.9%, $P = 0.001$)。结论:联合检测MDR1和BAALC基因表达有助于提高成人中危组AML的分层级预后判断,低MDR1/低BAALC的AML患者预后较好。

关键词

急性髓系白血病, MDR1, BAALC

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

成人急性髓系白血病中大约有45%的患者的染色体核型为正常,但是这组病例呈高度异质性。正常AML已发现有许多的基因或分子学异常与预后密切相关。现已经找到许多重要的预后因素,如FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3, 提示预后不良的因素)、NPM1 (nucleophosmin 1)以及CEBPA (CCAAT en-

hancer-binding protein-ALPHA)等。而某些基因的高表达如 MDR1 和 BAALC 等也已有报道其与 AML 预后不佳密切相关[1] [2]。

BAALC 基因位于染色体 8q22.3, 具有高度保守的基因序列和表达模式。BAALC 在神经外胚叶和造血发育过程中起着重要作用。在造血细胞中, BAALC 仅表达在造血祖细胞, 而在成熟的骨髓细胞和外周血中未表达。而在某些 ALL 的亚型以及正常核型 AML 中可发现 BAALC 高表达, 与提示预后不佳。高 BAALC 表达 AML 患者 CR 率低, OS 较低[3] [4]。我们前期研究发现 BAALC 可以通过影响白细胞细胞的增殖和凋亡来导致其出现耐药[3]。

MDR1 是白血病化疗药物耐药的主要介质, 可产生渗透性糖蛋白 P-gap。MDR1 基因的表达与细胞抑制类药物细胞骨保留有关, 导致白细胞细胞耐药。研究显示 MDR1 基因表达水平与白血病病人的治疗反应及生存相关[3]。

本研究中, 我们用实时定量 PCR 方法联合检测 105 例 NCCN 分层为中危组初治 AML 患者骨髓中 MDR1 和 BAALC 基因的表达水平, 并分析其临床意义。

2. 材料与方法

2.1. 标本来源

收集 2004 年 1 月至 2012 年 1 月南方医科大学南方医院血液科按 NCCN 确诊为中危组的 105 例初治 AML 的骨髓标本。核型分析采用染色体 G 显带技术或间期荧光原位杂交(FISH)技术。因 M3 具有独特的预后和治疗策略, 本研究未分析 M3 病例。入组的病人年龄为 18~65 岁。治疗方案: AML 患者诱导化疗方案为蒽环类药物 3d (去甲氧柔红霉素 8~10 mg/m² 或柔红霉素 45~60 mg/m²)联合阿糖胞苷 100~200 mg/m² × 7 d 的方案; 巩固治疗方案为诱导化疗方案或中剂量阿糖胞苷。诊断和疗效标准参照张之南主编的《血液病诊断与疗效标准》[5]。

2.2. RNA 抽提

收集培养的 10⁷ 个 KASUMI-1 细胞; 应用 Trizol (Gibcol 产品)提取总 RNA, 经紫外分光光度计测定 A260 nm/A280 nm 比值, 鉴定 RNA 纯度及定量后, -80℃ 冰箱冻存备用。

2.3. 引物和探针的设计合成

从 GENE BANK 上查找 MDR1 和 BAALC 基因碱基序列, 所有引物经 BLAST 验证未见非目的基因扩增, 各引物与各探针均不形成二聚体。MDR1 上游引物序列 5'-CAAGATCCTCCTGCTGGATGA; 下游引物序列 5'-GAACCA CTGCTTCGCTTTCTG; 探针 ACGTCAGCCTTGGAC。BAALC 上游引物序列: 5'-CCATCGAGCCCCGCTACT; 下游引物序列 5'-CGAGAGCTGGACCCGGGAGACA; 探针 CGAGAGCTGGACCCGGGAGACA。采用 GAPDH 为内参基因, 上游引物序列 5'-GAAGGTGAAGTTCGGAGTC, 下游引物序列 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC, 探针 5'-CAAGCTTCCC GTTCTCAGCC。探针 5'端标记荧光报告基团 FAM, 3'端标记不发光的 TAMRA 基团。引物及探针由广州英骏公司合成。

2.4. 荧光定量 PCR 标准模板的构建

从 KASUMI-1 细胞提取的 RNA, 采用 T/A 克隆的原理, pUCm-T 载体购自 TAKARA 公司, 载体与片段的摩尔比例为 1:3, 连接、转化到大肠杆菌 DH5 α , 培养阳性克隆并提取质粒, 纯化后-20℃ 保存备用。

2.5. 荧光定量 PCR 检测 MDR1 和 BAALC 基因表达

荧光定量 PCR 分别扩增 MDR1 和 BAALC 基因 mRNA, 两个基因的扩增体系和条件一致。50 μ l 反应体积内含 AMV/Tfl 5 \times 反应缓冲液 10 μ l, 0.2 mM dNTP 混合物, 特异上下游引物各 50 pmol, 特异性荧光探针 15 pmol, 25 mM MgSO₄ 2 μ l, 1 mM AMV 反转录酶(5 U/ μ l) 1 μ l 及 Tfl DNA 聚合酶(5 U/ μ l) 1 μ l, 无核酸酶水及总 RNA 1 μ g, 反应条件为 42 $^{\circ}$ C 30 min 反转录后 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 5 个循环后 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环。反应结束后软件自动计算出 mRNA 的拷贝数。考虑到各个样本总 RNA 浓度可能存在差异, 最终计算结果采用 $2^{-\Delta\text{CT}}$ 值($\Delta\text{CT} = \text{MDR1}/\text{BAALC-GAPDH}$)来表达 ERG 基因的表达水平。

2.6. 统计学方法

由于 AML 患者相对于正常人群 MDR1 和 BAALC 基因普遍高表达, 本研究中分别采用 AML 患者 MDR1 和 BAALC 基因表达量的中位数做为区分 MDR1 和 BAALC 基因表达水平高低的界点(cut-off point)。两组计量资料间分布比较用 Mann-whitney U test; 两组以上计量资料间分布比较用 Kruskal-wallis test 及 Bonferroni test; 两变量间相关分析采用 Spearman rank correlation test; 率的比较采用卡方检验; 生存分析采用 Kaplan Meier analyses, 不同生存曲线间差异采用 log-rank test。所有检验以 $P < 0.05$ 为显著统计学差异, 双侧检验。

3. 结果

3.1. 初治中危组 AML 患者 MDR1 和 BAALC 基因的表达水平与临床特征的关系

105 例中危组 AML 患者中位年龄 38.0 ± 12.9 岁, 其中男性 53 例, 女性 52 例。根据两基因表达水平的中位数为分界点, 各自分为高 MDR1 ($n = 53$)、低 MDR1 ($n = 52$) 表达组以及高 BAALC ($n = 53$)、低 BAALC ($n = 52$) 表达组。初治中危组 AML 患者中 MDR1 和 BAALC 基因高表达组与低表达组间年龄、性别、FAB 亚型、外周血 WBC、骨髓原始幼稚细胞比例的差异见表 1, 结果提示其间的差异均无统计学意义(P 值均 > 0.05)。

Table 1. Patient demographic and disease characteristics stratified by MDR1 and BAALC expression ($n = 105$)

表 1. AML 患者 MDR1 和 BAALC 基因表达水平及与临床特征的关系

临床特点	总计 (N = 105)	高MDR1 (N = 53)	低MDR1 (N = 52)	<i>P</i>	高BAALC (N = 53)	低BAALC (N = 52)	<i>P</i>
年龄	38.0 ± 12.9	37.8 ± 12.6	38.1 ± 13.3	0.922	40.1 ± 12.7	35.8 ± 12.8	0.091
性别n (%)							
女性	52 (49.5)	25 (47.2)	27 (51.9)	0.772	28 (52.8)	24 (46.2)	0.494
FAB分型				0.851			0.857
M1	3	2	1		2	1	
M2	38	20	18		19	19	
M4	12	7	5		7	5	
M5	36	19	17		21	15	
M6	2	0	2		1	1	
MDS转化	6	3	3		2	4	
未定型	8	4	4		3	5	
WBC	49.4 ± 68.9	58.5 ± 72.9	40.2 ± 63.8	0.175	42.7 ± 70.0	56.0 ± 67.7	0.326
骨髓原始细胞比例	62.6 ± 24.7	62.7 ± 25.1	62.5 ± 24.6	0.956	63.2 ± 26.9	62.0 ± 22.6	0.815

3.2. 中危组中低 BAALC/高 MDR1、高 BAALC/低 MDR1 以及高 BAALC/高 MDR1 三组的临床预后相似

本研究中 MDR1 与 BAALC 基因表达水平两者间存在相关性($r = 0.462, P = 0.000$)。为了研究 MDR1 和 BAALC 表达水平在中危核型组间的意义, 我们根据两者表达水平将本组病例分为四组: 高 BAALC/高 MDR1 ($n = 36$), 低 BAALC/低 MDR1 ($n = 35$), 低 BAALC/低 MDR1 ($n = 17$)以及高 BAALC/低 MDR1 ($n = 17$)。如表 2 和图 1 所示, 低 BAALC/高 MDR1、高 BAALC/低 MDR1 以及高 BAALC/高 MDR1 三组间在 CR 率、复发率以及 OS 间的差异无统计学意义。这三组病例间显示出相似的临床预后, 因此我们将这三组合并为高 MDR1 和/或高 BAALC 表达组。

3.3. 中危组 AML 中低 MDR1/低 BAALC 表达的 AML 患者预后良好

低 MDR1/低 BAALC 表达组与高 MDR1 和/或高 BAALC 表达组比较, 其 CR 率更高($91.4\% \text{ vs } 72.9\%, P = 0.028$), 复发率更低($15.6\% \text{ vs } 52.9\%, P = 0.001$), 如表 3。生存分析结果提示低 MDR1/低 BAALC 表达组的 OS 明显优于高 MDR1 和/或高 BAALC 表达组 ($79.7\% \text{ vs } 25.3\%, P = 0.000$), 如图 2。

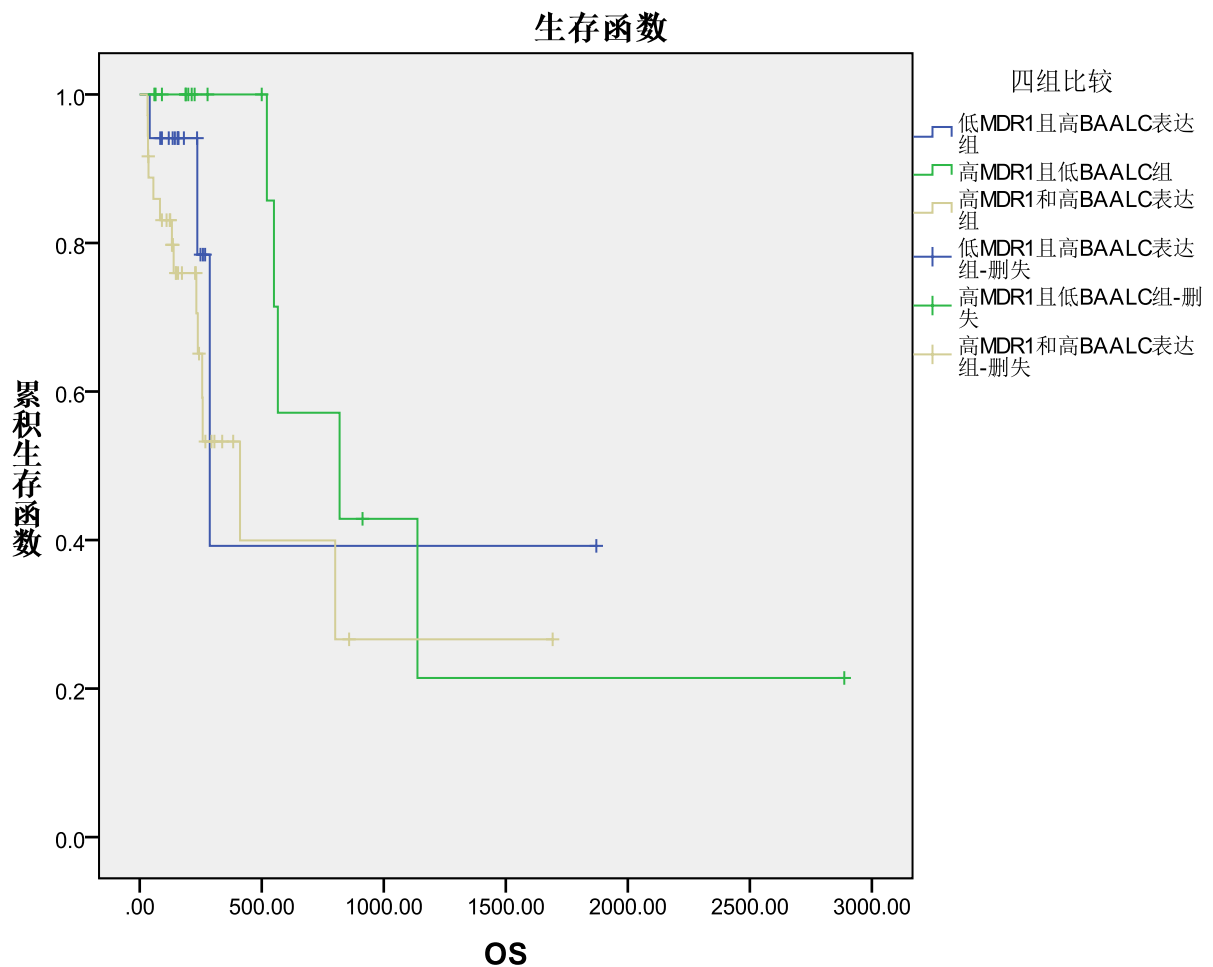


Figure 1. Kaplan-Meier analyses of overall survival (OS) showing not statistical difference among three groups (low MDR/high BAALC, high MDR/low BAALC, high MDR/high BAALC) in IR-AML

图 1. Kaplan Meier 分析 AML 高 MDR1/低 BAALC 组、高 MDR1/低 BAALC 以及高 MDR1/高 BAALC 表达水平病例的生存曲线图

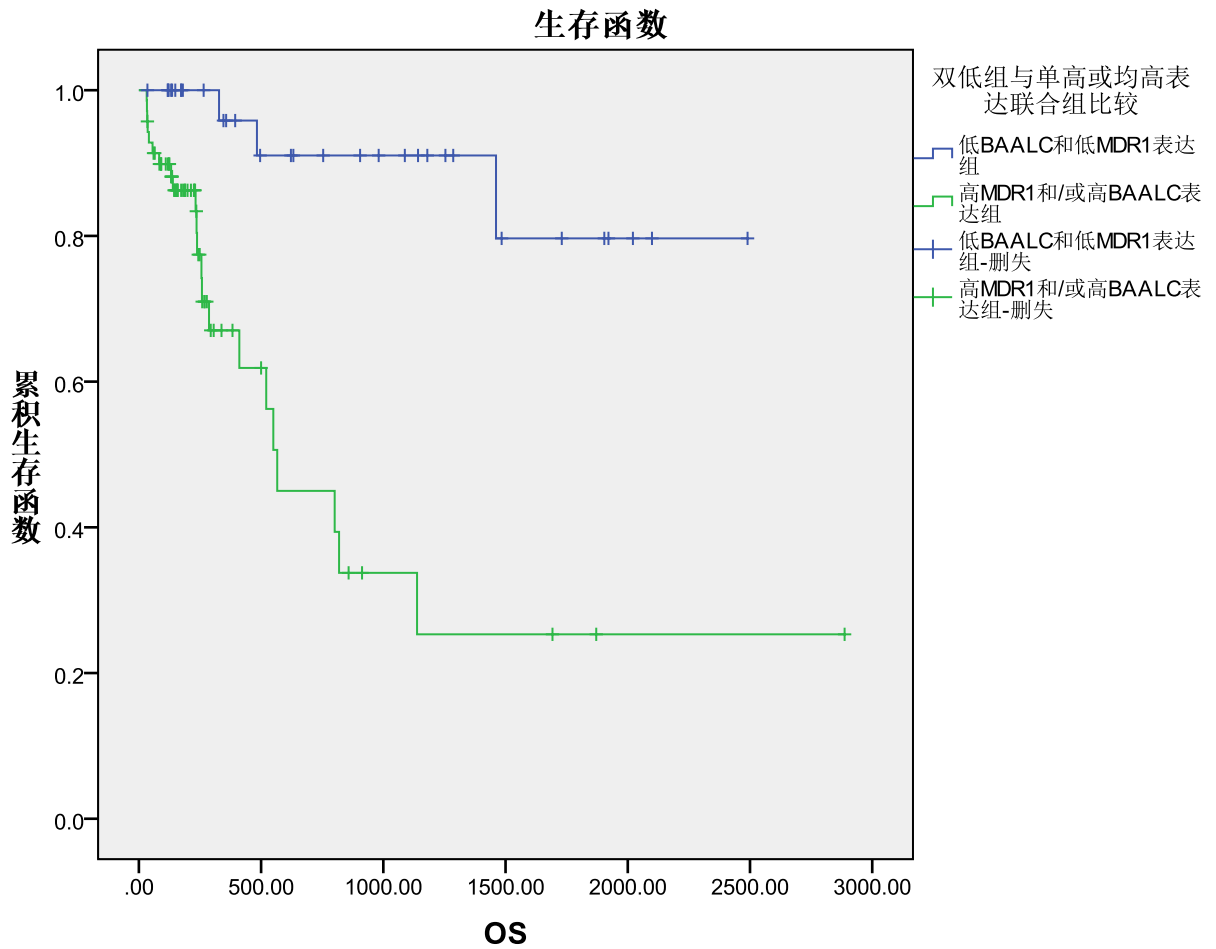


Figure 2. Kaplan-Meier analyses of overall survival (OS) showing a favorable outcome for patients with low *MDR1*/low *BAALC* compared with patients with high *MDR1* and/or high *BAALC* expression

图 2. Kaplan-Meier 分析 AML 患者低 *MDR1*/低 *BAALC* 组与高 *MDR1* 和/或高 *BAALC* 表达组病例的生存曲线图

Table 2. Patients with high *MDR1* or *BAALC* expression in intermediate-risk group demonstrated a similar clinical outcome

表 2. 中危组中高 *MDR1* 和/或高 *BAALC* 表达组间临床预后相似

Outcome	low <i>MDR1</i> /high <i>BAALC</i> [*] (n = 17)	high <i>MDR1</i> /low <i>BAALC</i> ^{&} (n = 17)	high <i>MDR1</i> /high <i>BAALC</i> [#] (n = 36)	<i>P</i>
CR n (%)	12 (70.6)	13 (76.5)	26 (72.2)	0.921
Relapse n (%)	7 (55.3)	7 (53.8)	13 (50.0)	0.889

^{*}低 *MDR1*/高 *BAALC* vs 高 *MDR1*/低 *BAALC*, *P*(CR) = 0.697; *P*(复发率) = 0.821; [&]高 *MDR1*/低 *BAALC* vs 高 *MDR1*/高 *BAALC*, *P*(CR) = 0.743; *P*(复发率) = 0.821; [#]低 *MDR1*/高 *BAALC* vs 高 *MDR1*/高 *BAALC*, *P*(CR) = 0.902; *P*(复发率) = 0.632。

Table 3. Low *MDR1*/low *BAALC* expressers have a better clinical outcome in IR-AML

表 3. 中危组 AML 中低 *MDR1*/低 *BAALC* 表达组 AML 病人预后良好

	中危组AML (N = 105)		<i>P</i>
	低 <i>MDR1</i> /低 <i>BAALC</i> (n = 35)	联合组(n = 70)	
CR n(%)	32 (91.4)	51 (72.9)	0.028
复发n(%)	5 (15.6)	27 (52.9)	0.001

4. 讨论

目前已证实白血病的发生和发展是多种相关基因表达失常或/和抑癌基因失活所致。例如正常基因突变或缺失、癌基因和耐药基因的异常扩增和表达、抗凋亡基因功能受抑等。由此可见, 单个基因的多效性以及多个基因的协同作用和机体免疫因素最终决定白血病发生和发展[2]。MDR 是最常见的肿瘤耐药现象, 多药耐药 1 基因(Multidrug resistance 1, MDR1)是目前研究较多且研究较为系统的耐药机制相关基因之一[6]。BAALC 基因定位于染色体 8q22.3, 正常情况下仅表达于神经外胚层来源组织和 CD34⁺早期造血细胞而不出现在成熟的骨髓细胞, 在部分 AML、ALL 和 CML 急变期(CML-BP)患者中存在高表达, 而在 CML 慢性期(CML-CP)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)则不表达。BAALC 基因高表达可以作为一种新的判断预后的分子标志[6]。

在此次研究中, 我们采用了联合检查的方法, 检测了 105 例初治中危组 AML 患者的 MDR1 和 BAALC 基因表达水平。统计结果显示: 中危组 AML 患者 MDR1 基因表达水平与 BAALC 基因表达水平存在相关性。进一步联合检测 MDR1 和 BAALC 基因水平, 发现两基因不管单一高表达或双高表达组之间的预后均较差, MDR1 和 BAALC 均低表达组预后最好。进一步分析发现 MDR1 和 BAALC 均低表达组与核型良好组之间的预后分析结果相近。由于本研究中病例数较少, 可能导致结果出现偏差。我们将进一步扩大病例数并延长随访时间以证明我们的结果。

本研究联合检测中危组 AML 患者骨髓中 MDR1 和 BAALC 基因表达水平并分析及与临床预后的意义。我们结果提示中危组 AML 患者中低 MDR1/低 BAALC 表达组预后良好, 提示这组病人在治疗策略上可以更偏向于与预后良好核型 AML 病人组。

基金项目

本研究由国家青年基金 81400104、广东省自然科学基金 2014A030313274 资助。

参考文献 (References)

- [1] Estey, E. (2016) Acute Myeloid Leukemia - Many Diseases, Many Treatments. *The New England Journal of Medicine*, **375**, 2094-2095. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1611424>
- [2] Copelan, E.A., et al. (2015) Use of Molecular Markers to Determine Postremission Treatment in Acute Myeloid Leukemia with Normal Cytogenetics. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, **8**, 143-149. <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2015.09.003>
- [3] Guo, X., et al. (2014) Low MDR1 and BAALC Expression Identifies a New Subgroup of Intermediate Cytogenetic Risk Acute Myeloid Leukemia with a Favorable Outcome. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, **53**, 144-148.
- [4] Weber, S., et al. (2014) BAALC Expression: A Suitable Marker for Prognostic Risk Stratification and Detection of Residual Disease in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *Blood Cancer Journal*, **4**, e173. <https://doi.org/10.1038/bcj.2013.71>
- [5] 张之南. 血液病诊断与疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [6] Ho, M.M., Hogge, D.E. and Ling, V. (2008) MDR1 and BCRP1 Expression in Leukemic Progenitors Correlates with Chemotherapy Response in Acute Myeloid Leukemia. *Experimental Hematology*, **36**, 433-442. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.11.014>

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：acm@hanspub.org