

急性髓细胞性白血病(AML)中 IL-3R α 基因的表达及意义

宋玉华 彭 鹏[△] 邱少敏 王清波 谈国蕾

(东南大学医学院附属南京市第二医院肿瘤科 江苏 南京 210003)

摘要 目的:检测白介素-3受体 α 亚基(IL-3R α)在急性髓细胞性白血病(acute myeloid leukemia, AML)中的表达,研究其在AML发病和预后评估中的意义。方法:应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测57例AML患者IL-3R α 的表达,其中包括52例初治和复发患者(6例M1、28例M2、10例M3、3例M4、5例M5)及5例缓解患者,另10例正常人作为对照。结果:①10例正常人和5例AML缓解患者未检测到IL-3R α 表达。②52例初治和复发的AML患者中IL-3R α 阳性表达21例,占40.38%,M1~M5各型患者的阳性率差异无显著性($P>0.05$)。初治和复发AML患者之间IL-3R α 阳性表达无明显差异($P>0.05$)。③AML患者的IL-3R α 阳性表达与外周血白细胞计数、骨髓中原始细胞比例、CD34阳性表达有关($P<0.05$)。④AML患者中IL-3R α 阳性表达的患者CR率低于阴性者($P<0.05$)。结论:①IL-3R α 在AML发病中有一定作用。②IL-3R α 基因可作为AML预后不良的一个指标。

关键词: 白介素-3受体 α 亚基(IL-3R α) 急性髓细胞性白血病

中图分类号: R733.7 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)19-3632-03

Expression of IL-3R α in Acute Myeloid Leukemia(AML) and its Significance

SONG Yu-hua, PENG Peng[△], QIU Shao-min, WANG Qing-bo, TAN Guo-lei

(Department of Oncology, Affiliated Nanjing Second Hospital of the Medical College of Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210003, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and significance of IL-3R α in 57 patients with acute myeloid leukemia (AML). **Methods:** RT-PCR method was performed to examine the expression of IL-3R α in bone marrow or peripheral blood mononuclear cells from 57 patients with AML. The patients included 52 newly diagnosed and relapse patients (6 M1, 28 M2, 10 M3, 3 M4, 5 M5) and 5 CR patients. 10 healthy subjects were used as control group. **Results:** ①5 CR patients didn't express IL-3R α mRNA. ②The percentage of IL-3R α mRNA expression in AML was 40.38%. IL-3R α mRNA was expressed in all AML subtypes, and there was no difference among AML subtypes. In AML patients, there was no difference between newly diagnosed and relapse patients. ③In AML patients, the expression of IL-3R α mRNA related to white blood count, blast cells ratio and CD34 positive expression ($P<0.05$). ④The CR rate of AML patients who expressed IL-3R α was significantly lower than that of who didn't express IL-3R α ($P<0.05$). **Conclusions:** ①IL-3R α gene might play an important role in the pathogenesis of AML. ②IL-3R α gene may be a poor prognostic factor in AML.

Key words: The interleukin-3 receptor α chain(IL-3R α); Acute myeloid leukemia(AML)

Chinese Library Classification(CLC): R733.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)19-3632-03

白血病是造血系统的恶性肿瘤,其特征 α 造血细胞分化成熟受阻,未分化细胞大量增殖。研究表明,IL-3能诱导白血病细胞的增殖,抑制其凋亡^[1],IL-3通过诱导淋系和髓系细胞自主增殖而在白血病中发挥重要作用^[2],而IL-3R α 决定着IL-3与IL-3结合的特异性。鉴于此,IL-3R α 可能是白血病形成的一个重要分子。国外的初步研究资料表明,IL-3R α 在急性白血病中表达有所增高^[3]。本研究拟通过检测AML各亚型白血病患者IL-3R α 的表达,探讨IL-3R α 基因在急性白血病发病和预后评估中的意义。

1 资料和方法

1.1 临床资料

2004年9月-2009年11月间收集的徐州医学院附属医院

血液科和儿科的AML病例共57例,其中男性34例,女性23例,年龄9~66岁,平均 34.2 ± 16.4 岁,其中初治患者49例、复发患者3例、CR 5例。所有患者符合均FAB或MICM分型诊断标准。除M3以外的AML患者接受标准的DA(柔红霉素+阿糖胞苷)、TA(吡喃阿霉素+阿糖胞苷)、NA(米托蒽醌+阿糖胞苷)方案联合化疗方案,M3患者主要用维甲酸和/或三氧化二砷治疗。健康对照组10名(男性5名,女性5名,平均年龄 30.5 ± 6.4 岁),为正常献血员和骨髓移植供髓者。

1.2 检测方法

1.2.1 试剂 检测所使用的逆转录酶、RNA酶抑制剂购自Promega公司;细胞总RNA Trizol抽提试剂盒、引物及相关试剂购自上海生工生物工程有限公司。

1.2.2 标本制备 取肝素抗凝外周血5mL或骨髓液2mL,用淋巴细胞分离液Ficoll-Hypaque密度梯度离心分离单个核细胞(MNC),取 5×10^7 个MNC用于细胞总RNA的抽提。

1.2.3 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定 IL-3R α mRNA的表达 应用Trizol抽提试剂盒提取MNC的总RNA,然后逆转

作者简介:宋玉华(1979-),女,主治医师,硕士,研究方向:肿瘤学, E-mail:53736572@qq.com

[△]通讯作者:彭鹏, E-mail:doctorpp@qq.com

(收稿日期:2011-10-31 接受日期:2011-11-26)

录成 cDNA 并进行 PCR 扩增 ,IL-3R 上游引物 5' - TCT CCA GCG GTT CTC AAA GTT CCC ACA TCC -3' ;下游引物 5' - CCC AGA CCA CCA GCT TGT CGT TTT GGA AGC -3' ,扩增产物长度为 555bp。扩增条件 :94℃预变性 5 min ,94℃变性 40 s ,56℃退火 45s ,72℃延伸 90 s ,35 个循环后 72℃再延伸 7 min。PCR 产物经 PCR 纯化系统纯化后 ,用 PST1 酶酶切鉴定 ,预计酶切片段为 459bp 和 96bp ,酶切产物用 1.7%的琼脂糖凝胶鉴定。将同一标本 IL-3Rα 和 GAPDH 的 PCR 产物混匀 ,取混匀后产物 7μL 加样于 1.7%琼脂糖凝胶上 ,80V 恒压 ,电泳 60 min 后 ,在 UVP 凝胶成像系统下观察并摄片。

1.2.4 免疫表型测定 采集患者骨髓液或外周血 (幼稚细胞比例≥ 50%) ,肝素抗凝。流式细胞仪型号为 FACS Calibur ,激发光为 488nm 氩离子 ,FITC 滤光片 525nm ,PE 滤光片 575nm。采用全血单抗双标记法 ,检测 10000 个以上细胞 ,CD45-SSC 设门法分析结果 ,所用干 / 祖细胞单抗为 CD34。CD34 抗原阳性细胞≥ 20%为标准。

1.3 统计学处理

计量资料比较采用 t 检验、Levene 方差齐性检验、秩和检验 ,计数资料比较采用 X² 检验、Fisher 确切概率法 ,应用 SPSS 11.5 软件包进行数据处理 ,P<0.05 为有统计学意义。

2 结果



图 1 IL-3Rα PCR 产物 PST1 酶切结果

1 :IL-3Rα PCR 产物 2 :PST1 酶切产物 M :100bp marker

Fig. 1 Gel electrophoretogram of the PST1 digested products of IL-3Rα. Lane 1: RT-PCR products of IL-3Rα gene; Lane 2: PST1 digested products of IL-3Rα gene; M: 100bp DNA marker

2.1 IL-3Rα 表达与 AML FAB 分型

10 例正常人和 5 例完全缓解患者未检测到 IL-3Rα 的表达。52 例初治和复发 AML 患者中 IL-3Rα 阳性表达 21 例 ,占 40%。AML 患者 M1~M5 各亚型阳性率无显著差异。IL-3Rα PCR 产物 PST1 酶切结果见图 1。部分 AML 患者 IL-3Rα PCR 产物电泳见图 2。

2.2 IL-3Rα 表达与 AML 临床特征

AML 患者中 IL-3Rα 阳性组与阴性组的性别、年龄、外周血血小板计数、血红蛋白水平无明显差异(P>0.05)。IL-3Rα 阳性组的外周血白细胞计数、骨髓中原始细胞数较阴性组增高(P<0.05)。WBC≥ 50× 10⁹/L 的 AML 患者 IL-3Rα 阳性表达率高于 WBC≤ 50× 10⁹/L 的患者 (P<0.05) ;骨髓中原始细胞比例≥ 80%的 AML 患者 IL-3Rα 阳性表达率原始细胞比例< 80%的 AML 患者增高(P<0.05) ,IL-3Rα 阳性组的 CD34 表达阳性率高于阴性组(P<0.05)。IL-3Rα 阳性的 AML 患者经标准化疗 1-2 个疗程后完全缓解率低于用类似化疗方案的 IL-3Rα 阴性患者(P<0.05) ,见表 1。

3 讨论

白细胞介素 -3 (IL-3) 是一种造血生长因子(HGF) ,可作用于早期造血干 / 祖细胞 ,促进髓系、红系、巨核系等造血祖细胞的分化发育^[4,5]。IL-3 通过与靶细胞膜上的特异性高亲和力受体结合发挥其生物学功能。IL-3R 属于 I 型造血因子受体超家族 ,是由 70kD 的 α 亚基和 120-140kD 的 β 亚基组成的异二聚体。IL-3R 的 α 亚基是 IL-3 结合的蛋白 β 亚基为 IL-3、GM-CSF、

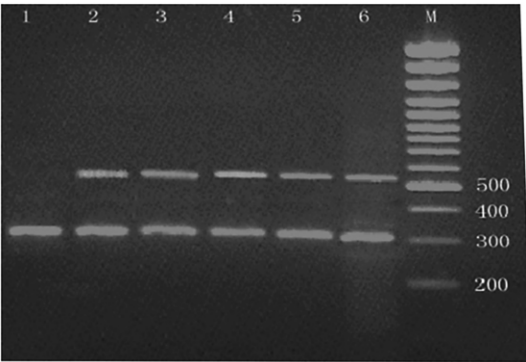


图 2 AML 患者 IL-3Rα PCR 产物电泳图

1 :健康对照 2-6 :AML 患者样本 M :100bp marker ;

Fig. 2 Gel electrophoretogram of AML patients RT-PCR products for IL-3Rα gene. Lane 1: healthy subjects sample; Lane 2-6: AML patients samples;M: 100bp DNA marker

表 1 IL-3Rα 表达与 AML 临床特征的关系

Table 1 The expression of IL-3Rα in acute myeloid leukemia(AML)

Group	Characteristic index			
	WBC(× 10 ⁹ /L)	Blast cells ratio(%)	CD34(positive negative)	CR ratio
IL-3Rα positive	79.46± 84.04	70.50± 21.73	10 :11	8:13
IL-3Rα negative	18.54± 21.57*	58.76± 18.26*	5 :26*	23:8*

注 :与相应的 IL-3Rα+ 组比较 ,* P<0.05 ,有统计学意义。

Note: Compared with the corresponding IL-3Rα positive group ,*P<0.05 , with statistical significance.

IL-5 共用亚基, 又称 β_c , 它本身不结合 IL-3, 与 α 亚基结合后形成高亲和力的受体^[6]。IL-3 与其受体结合, 诱导 Janus 激酶 (JAK) 家族 JAK2 酪氨酸激酶活化, 活化的 JAK2 又可激活信号转导和转录因子激活物 (STATs), 使之转入细胞核, 影响某些基因的转录和特定蛋白的翻译, 调控细胞的增殖和分化。另外, JAK2 受体复合物还可通过 Ras2 丝裂活化蛋白激酶 (MAPK) 途径, 促进某些基因的转录, 使细胞保持存活状态, 抑制其凋亡。人类 IL-3R α 亚基又称为 CD123, 由 378 个氨基酸组成, 含一个胞外区、一个跨膜区和一个短的胞内区, 它的 N 端和 C 末端分别在与 IL-3 结合和信号转导过程中发挥重要作用^[7]。许多研究证实, IL-3R α 的胞外区是受体功能必需的, 可以刺激不同的信号通路^[8], 提示了 α 亚基的胞外区在信号转导通路中起关键作用。白血病是造血系统恶性肿瘤, 其特征是造血细胞分化成熟受阻, 未分化细胞大量增殖。急性白血病细胞在 HGF 刺激下, 能增殖存活, 但极少分化成熟^[9]。有证据表明, 白血病原始细胞的自主增殖可能与自分泌 HGF^[9]或由 HGFR 引发的信号转导^[10, 11]有关。在超过 80% 的 AML 中, 重组 IL-3 能诱导白血病克隆、DNA 合成。Steelman 等^[12]提出 IL-3R α 基因的异常表达能使造血细胞获得增殖优势, 进而导致白血病的发生。Sun 等^[13]也认为 IL-3R 的异常表达能促进白血病、淋巴瘤和变态反应等的发生。近来有文献报道, 急性白血病患者 IL-3R α 表达也有所增高^[14]。

为进一步了解急性白血病患者 IL-3R α 表达的情况, 我们采用 RT-PCR 方法测定其 mRNA 的表达。结果显示, 部分急性白血病患者 IL-3R α 表达的阳性率较高, 表明 IL-3R α 高表达者从基因转录水平即发生异常。本实验中, AML 患者 IL-3R α 阳性率为 40.38%, M1~M5 各亚型的表达无明显差异。关于 IL-3R α 表达与 AML FAB 分型相关性, Munoz^[15]等研究显示, M7 患者不表达 IL-3R α , 其余 AML 各型均有表达。Testa 等^[16]发现 IL-3R α 在 AML 患者各个 FAB 亚型(M0~M7)中均有表达, 而且表达强弱程度与 FAB 分型无关。我们没有收集到 M0、M6 和 M7 的患者, 未能进一步分析。实验结果显示, AML 初治和复发患者 IL-3R α 基因阳性率较高, 而缓解患者和正常人未检测到 IL-3R α 的表达。AML 患者 IL-3R α 表达高于正常人, 缓解和未缓解患者表达不同, 表明 IL-3R α 的表达在一定程度上可以反映病情的进展。研究结果证实了 AML 患者高表达 IL-3R α , 这与 Munoz 等^[15]、Giudice 等^[17]研究报告相一致。因此, IL-3R α 在 AML 发病中有一定作用, 可作为 AML 的一个分子标志。

有研究提出刺激 IL-3R α 可引起 AML 细胞增殖, IL-3R α 的过表达可能代表高度恶性白血病的进展^[14]。本实验研究了 IL-3R α 表达与临床特征的关系, 结果显示, AML 患者 IL-3R α 的表达与性别、年龄、血红蛋白水平、血小板计数无关, 与外周血白细胞计数、骨髓中白血病原始细胞比例增高有关 ($P < 0.05$), 即外周血白细胞 $\geq 50 \times 10^9/L$ 或骨髓中原始细胞比例 $\geq 80\%$ 的 AML 患者的 IL-3R α 阳性表达率增高, 提示了 IL-3R α 在白血病原始细胞增殖中有一定作用, IL-3R α 的阳性表达可能有利于白血病细胞的增殖。有研究认为 CD34 在急性白血病细胞高表达是急性白血病预后不良的因素之一^[18, 19]。Riccioni 等^[20]研究证实 IL-3R α 与 CD34 有关。我们研究结果证实 IL-3R α

的表达与 CD34 的表达相关。Testa 等^[16]研究提出高表达 IL-3R α 的患者化疗后 CR 率低、生存期短。我们的实验分析了 IL-3R α 表达与 AML 治疗疗效的相关性。AML 患者, IL-3R α 阳性组标准化疗 1~2 个疗程后 CR 率低于阴性表达组 ($P < 0.05$)。且 IL-3R α 阳性表达与外周血白细胞计数、骨髓中白血病原始细胞等相关。因而, 我们认为 IL-3R α 阳性可能是 AML 患者预后不良的指标之一。

参考文献(References)

- [1] Sisk TJ, Roys S, Chang CH. Self-Association of C β TA and Its Transactivation Potential [J]. Molecular and Cellular Biology, 2001, 21 (15):4919-4928
- [2] Casoli C, De Lerma Barbaro A, Pilotti E, et al. The MHC class II transcriptional activator (CIITA) inhibits HTLV-2 viral replication by blocking the function of the viral transactivator Tax-2 [J]. Blood, 2004, 103(3):995-1001
- [3] Raval A, Weissman JD, Howcroft TK, et al. The GTP-binding domain of class II transactivator regulates its nuclear export [J]. J Immunol, 2003, 170(2):922-930
- [4] Hake SB, Masternak K, Kammerbauer C, et al. C β TA Leucine-Rich Repeats Control Nuclear Localization, In Vivo Recruitment to the Major Histocompatibility Complex (MHC) Class II Enhanceosome, and MHC Class II Gene Transactivation [J]. Molecular and Cellular Biology, 2000, 20(20):7716-7725
- [5] Cressman DE, William J. O' Connor, Susanna F. Greer, et al. Mechanisms of nuclear import and export that control the subcellular localization of class II transactivator [J]. J Immunol, 2001, 167(7):3626-3634
- [6] Li GX, Harton JA, Zhu XS, et al. Downregulation of C β TA Function by Protein Kinase A (PKA)-Mediated Phosphorylation: Mechanism of Prostaglandin E, Cyclic AMP, and PKA Inhibition of Class II Major Histocompatibility Complex Expression in Monocytic Lines [J]. Molecular and Cellular Biology, 2001, 21(14):4626-4635
- [7] Zhu XS, Linhoff MW, Li GX, et al. Transcriptional Scaffold: CIITA Interacts with NF-Y, RFX, and CREB To Cause Stereospecific Regulation of the Class II Major Histocompatibility Complex Promoter [J]. Molecular and Cellular Biology, 2000, 20(16):6051-6061
- [8] Harton JA, Ting PY. Class II Transactivator: Mastering the Art of Major Histocompatibility Complex Expression [J]. Molecular and Cellular Biology, 2000, 20(17):6185-6194
- [9] Holling TM, Stoep N, Quinten E, et al. Activated Human T Cells Accomplish MHC Class II Expression Through T Cell-Specific Occupation of Class II Transactivator Promoter III [J]. The Journal of Immunology, 2002, 168:763-770
- [10] Athena WW, Ghosh N, Karen P. McKinnon, et al. Regulation and Specificity of MHC2TA Promoter Usage in Human Primary T Lymphocytes and Cell Line [J]. The Journal of Immunology, 2002, 169:3112-3119

(下转第 3627 页)

- [5] Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, et al. phase trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer [J]. *J.Clin.Oncol*, 2001,19:289-298
- [6] Sauthoff H, Hu J, Maca C, et al. Intratumoral spread of wild-type adenovirus is limited after local injection of human xenograft tumors: virus persists and spreads systemically at late time points [J]. *Hum. Gene Ther*, 2003,14:425-433
- [7] Zhou J, Gao Q, Chen G, et al. Novel oncolytic adenovirus selectively targets tumor-associated polo-like kinase 1 and tumor cell viability[J]. *Clin.Cancer Res*, 2005,11(23):8431-8440
- [8] Post LE. Selectively replicating adenoviruses for cancer therapy: an update on clinical development [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2002,3(12):1768-1772
- [9] Hou JG, Ding Q. Oncolytic Adenovirus and Cancer Therapy [J]. *Journal of Microbes and Infections*, 2009,4(1):35-39,64
- [10] Lens SM, Voest EE, Medema RH. Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010,10(12):825-841
- [11] Tsai V, Johnson DE, Rahman A, et al. Impact of human neutralizing antibodies on antitumor efficacy of an oncolytic adenovirus in a murine model[J]. *Clin.Cancer Res*, 2004,10:7199-7206
- [12] Andarini S, Kikuchi T, Nuliwa M, et al. Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer of OX40 ligand to tumor cells enhances antitumor immunity of tumor-bearing hosts [J]. *Cancer Res*, 2004,64:3281-3287
- [13] Ryan PC, Jakubczak JL, Stewart DA, et al. Antitumor efficacy and tumor-selective replication with a single intravenous injection of OAS403, an oncolytic adenovirus dependent on two prevalent alterations in human cancer[J]. *Cancer Gene Ther*, 2004,11:555-569
- [14] Wodarz D. Viruses as antitumor weapons: defining conditions for tumor remission[J]. *Cancer Res*, 2001,61:3501-3507
- [15] Rogulski KR, Freytag SO, Zhang K, et al. In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy[J]. *Cancer Res*, 2000,60:1193-1196
- [16] Ganly I, Kim YT, Hann B, et al. Replication and cytolysis of an E1B-attenuated adenovirus in drug-resistant ovarian tumor cells is associated with reduced apoptosis[J]. *Gene Ther*, 2001,8:369-375
- [17] Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al. A controlled trial of intratumor ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer[J]. *Nat.Med*, 2000,6:879-885

(上接第 3634 页)

- [11] Stoep N, Quinten E, Elsen PJ. Transcriptional Regulation of the MHC Class II Trans-Activator (CIITA) Promoter III: Identification of a Novel Regulatory Region in the 5'-Untranslated Region and an Important Role for cAMP-Responsive Element Binding Protein 1 and Activating Transcription Factor-1 in CIITA-Promoter III Transcriptional Activation in B Lymphocytes [J]. *The Journal of Immunology*, 2002,169:5061-5071
- [12] Zhou H, Su HS, Zhang X, et al. C/EBP β -dependent and -independent class II MHC expression revealed by a dominant negative mutant [J]. *J Immunol*, 1997,158(10):4741-4749
- [13] O'Keefe GM, Nguyen VT, Tang LP, et al. IFN- γ Regulation of Class II Transactivator Promoter IV in Macrophages and Microglia: Involvement of the Suppressors of Cytokine Signaling-1 Protein [J]. *The Journal of Immunology*, 2001,166:2260-2269
- [14] Hake SB, Tobin HM, Steimle V, et al. Comparison of the transcriptional regulation of classical and non-classical MHC class II genes [J]. *Eur J Immunol*, 2003,33(9):2361-2371
- [15] Zhou CH, Lu DR, Zhu QQ, et al. Effects of CIITA antisense RNA on the expression of HLA class II molecules [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2000,45(22):2068-2071
- [16] Testa U, Riccioni R, Militi S, et al. Elevated expression of IL-3R α in acute myelogenous leukemia is associated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognosis [J]. *Blood*, 2002,100:2980-2988
- [17] June BW, Felix NJ, Griffiths R, et al. Prolonged survival of class II transactivator-deficient cardiac allografts [J]. *Transplantation*, 2002,74(9):1341-1348
- [18] Lu X, Kallinteris NL, Li J, et al. Tumor immunotherapy by converting tumor cells to MHC class II-positive, IL-2 protein-negative phenotype [J]. *Cancer Immunol [J]. Immunother*, 2003,52(10):592-598
- [19] Meazza R, Comes A, Orengo AM, et al. Tumor rejection by gene transfer of the MHC class II transactivator in murine mammary adenocarcinoma cells [J]. *Eur J Immunol*, 2003,33(5):1183-1192
- [20] Riccioni R, Rossini A, Calabro L, et al. Immunophenotypic features of acute myeloid leukemias overexpressing the interleukin 3 receptor α chain [J]. *Leuk Lymphoma*, 2004,45(8):1511-1517