

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.04.008

缓解与未缓解髓系白血病干细胞表面抗原 CD34⁺CD123⁺ 表达差异研究 *

赖宗浪 李冬云 王 婧 张雅月 马 薇 陈信义[△]

(北京中医药大学东直门医院血液肿瘤科 北京 100700)

摘要 目的:探索缓解与未缓解急性髓系白血病干细胞表面抗原表达差异,为判定化疗疗效及其预后提供依据。**方法:**按照急性白血病诊断标准,根据患者入院时骨髓白血病细胞数量多少分成临床缓解与未缓解两组,以流式细胞仪分别检测骨髓中白血病干细胞表面相关抗原表达情况,比较二者之间差异。其中经标准化疗方案治疗结束后,通过复查骨髓象判定疗效并比较化疗前后白血病干细胞表面相关抗原表达变化。**结果:**与缓解的急性髓系白血病患者骨髓白血病干细胞相关抗原表达值相比,未缓解的患者骨髓白血病干细胞表面相关抗原表达明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05, 0.001$);未缓解的患者经标准方案化疗后骨髓虽然已经获得完全缓解,但依然具有白血病干细胞表面抗原高表达,提示这部分患者依然有复发的可能性。**结论:**急性髓系白血病患者的白血病干细胞相关抗原表达值升高是急性白血病复发难治的根源之一。

关键词:急性髓系白血病;白血病干细胞;白血病细胞表面抗原

中图分类号:R733.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)04-631-03

Expression Differences of Surface Markers CD34⁺CD123⁺ on Leukemia Stem Cells between Released and Relapsed Acute Myeloid Leukemia*

LAI Zong-lang, LI Dong-yun, WANG Jing, ZHANG Ya-yue, MA Wei, CHEN Xin-yi[△]

(Oncology and hematology department, Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing, 100700, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the differentiations of surface markers on leukemia stem cells between released and relapsed acute myeloid leukemia, and to lay the foundations for investigating the chemotherapeutic effect and prognosis. **Methods:** According to the standard of diagnosis of acute leukemia diseases, the hospitalized patients were divided into two groups of released and relapsed terms with their leukemia cells in the bone marrow, then the affiliated surface markers of leukemia stem cells and the expression differences between them were detected. After the standard chemotherapy, the therapeutic effect was evaluated through reviewing the myelogram. **Results:** Compared with surface markers on leukemia stem cells in released acute myeloid leukemia patients, surface markers in relapsed terms had been increased with statistical significance ($P<0.05, 0.001$). Although the relapsed patients got complete remission through standard chemotherapy, they still had large amounts of leukemia stem cells' surface markers, indicating these patients would possibly relapse. **Conclusion:** The rising of leukemia stem cells in acute myeloid leukemia patients is one of the foundations that induces refractory or relapsed acute leukemia.

Key words: Acute myeloid leukemia; Leukemia stem cell; Leukemia cell surface antigen

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

Article ID: 1673-6273(2014)04-631-03

前言

急性白血病复发或耐药目前仍是困扰临床的重大难题,越来越多的研究资料表明,复发耐药的原因在于患者体内存在着白血病干细胞(leukemia stem cell LSC),这群细胞虽然数量较少,但在启动白血病发生、进展复发过程中起着决定性作用。因此,知晓急性白血病患者骨髓是否存在 LSC,对化疗方案的制定、判定化疗效果以及预后具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 诊断标准 依照 1987 年中华医学会全国血液病学术会议拟定急性白血病诊断标准:①发病较急,发热,贫血,出血呈进行性加重,常伴有胸骨压痛、淋巴结及肝、脾肿大;②血红蛋白和血小板急剧下降,外周血中常见白血病细胞,可超过 30%以上;③骨髓增生极度活跃,以白血病细胞为主,原始细胞 + 早

* 基金项目:教育部高等学校博士点专项基金(20100013110008);北京市高校共建项目资助

作者简介:赖宗浪(1986-),男,博士研究生,研究方向:中西医结合防治白血病应用研究,

电话:010-84013145, E-mail:tmlzl@163.com

△ 通讯作者:陈信义,男,教授,博士生导师,电话:010-84013145, E-mail:chenxinyi0729@126.com

(收稿日期:2013-05-27 接受日期:2013-06-25)

(幼)细胞可 $\geq 30\%$;红系及巨核细胞减少;④应用细胞形态学、细胞化学、免疫学检查可确定白血病亚型(急性淋巴细胞白血病包括 L1、L2、L3 三个亚型;急性髓系白血病包括 M0、M1、M2、M4、M5、M6、M7 七个亚型)。

1.1.2 资料来源 从 2012 年 1 月至 9 月,北京中医药大学东直门医院临床共收集符合急性髓系白血病诊断标准的患者 11 例^[1]。其中,男性 8 例,女性 3 例;年龄 47-77 岁,平均年龄 57.1 ± 12.3 岁;M02 例,M13 例,M2 4 例,M41 例,M51 例。

1.2 研究方法

1.2.1 化疗方案选择 患者入院后依据机体整体状况,结合前期化疗方案应用,选择 HAE、FLAG、MA、CAG 化疗方案,进行一个疗程的化疗。

1.2.2 标本采集与处理 骨髓抽吸液加肝素抗凝,按照流式细胞术检测技术制备标本备检。流式细胞仪总共分析 10000 个细

胞,分别检测 CD34⁺、CD34⁺CD33⁺、CD34⁺CD123⁺ 表达值。

1.2.3 统计学处理方法 计数资料以百分比表示,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示;两组均数间比较采用成组 t 检验。方差不齐时用校正 t 检验,以 $P < 0.05$ 作为显著性差异。

2 结果

2.1 LSC 表面抗原表达差异

患者入院后按照 FAB 协作组关于急性白血病临床分型标准,将 11 例患者分临床缓解与未缓解两组,并分别抽取患者骨髓标本检测 LSC 表面抗原表达,并比较表达差异(表 1)。从表 1 可以看出,急性白血病临床完全缓解与未缓解患者的 LSC 表面抗原 CD34⁺、CD34⁺CD123⁺、表达比较,有统计学意义($P < 0.05$, 0.001)。表明急性白血病患者复发后有 LSC 表面抗原高表达。

表 1 LSC 表面抗原表达差异($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 1 Differentiations of leukemia stem cells' surface markers($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	n	CD34 ⁺	CD34 ⁺ CD123 ⁺	CD33 ⁺ CD123 ⁺
Released	7	1.44 $\pm$ 1.52	0.75 $\pm$ 1.16	0.99 $\pm$ 1.20
Rrelapsed	4	38.78 $\pm$ 19.55*	27.51 $\pm$ 27.17 [△]	28.67 $\pm$ 11.48

注:与 released group 比较,* $P < 0.001$;[△] $P < 0.05$ 。

Note: compared with the released group, * $P < 0.001$;[△] $P < 0.05$ 。

免疫表型是细胞功能和身份的标志,LSC 表面存在着很多特异性表面抗原,检测患者骨髓细胞 LSC 表面相关抗原可以判别化疗效果,并预测预后。有研究表明,急性髓系白血病各亚型的 LSC 十分相似,细胞表型大多为 CD34⁺、CD38⁻、CD71⁻、HLA-DR⁻、CD90⁻、CD117⁻、CD123⁺^[11-14]。CD34⁺ 是目前应用最多

的 LSC 分子表面标志物,可广泛表达与骨髓和外周血的造血干/祖细胞及具有造血潜能的各种集落形成细胞,CD34⁺ 细胞具有造血干细胞特征,可在体内长期重建造血^[15]。CD123⁺ 是白介素-3(IL-3)受体 α 链,Jordan 等研究发现 IL-3 受体 α 链在急性髓系白血病患者的 CD34⁺CD38⁻ 细胞中强表达,而在正常

表 2 治疗前后 LSC 检测结果(%)

Table 2 The results of leukemia stem cells before and after treatment

No	Prior treatment			Post treatment		
	CD34 ⁺	CD34 ⁺ CD123	CD33 ⁺ CD123 ⁺	CD34 ⁺	CD34 ⁺ CD123 ⁺	CD33 ⁺ CD123 ⁺
1	34.13	3.56	28.27	3.56	3.20	0.86
2	0.66	0.23	0.41	3.57	1.20	3.42
3	1.32	0.16	1.62	0.41	0.1	0.49

注:序号 1:未缓解患者,序号 2、3 为临床完全缓解患者。

Note: No.1:the relapsed patient, No.2, No.3: the clinical released patient.

2.2 治疗前后 LSC 检测

患者入院后,缓解患者巩固化疗,未缓解患者继续诱导缓解治疗。11 例患者有 8 例自愿接受化疗,其中,缓解患者 6 例,为缓解 2 例。8 例患者全部完成一个周期的化学治疗。复发 2 例也已达到临床完全缓解。有 3 例患者进行治疗前后 LSC 表面抗原检测(缓解 2 例,未缓解 1 例),检测结果见表 2。从表 2 看出,未缓解患者常规化疗后,骨髓已经获得完全缓解,但依然具有 LSC 表面抗原高表达。提示这部分患者依然有复发的可能性。

3 讨论

急性白血病复发或耐药目前是困扰临床的重大难题,越来

越多的研究资料表明复发耐药的原因在于患者体内存在着 LSC^[2,3]。LSC 基本生物特性决定了白血病难治与耐药,白血病患者骨髓中的 LSC 处于 G0 期,对细胞周期性化疗药物不敏感,并且 LSC 对细胞生长因子等反应性差,难以被细胞因子活化而进入细胞周期;LSC 存在多药耐药蛋白(Multiple drug resistance, MDR)高表达,其具有能量依赖性“药泵”的功能,可将抗癌药物主动转运出细胞。故逃逸周期特异性药物的攻击及对化疗药物的耐药使得急性白血病患者不能取得临床缓解^[4,8]。LSC 还可通过不对称分裂来实现其自我更新,不对称分裂使得一个子细胞走向分化的终端形成一些增殖能力有限的白血病细胞,另一个保持亲代的特征,这也是 LSC 维持稳定的细胞数量,引起并造成白血病复发的根本原因^[9,10]。

造血干细胞中却检测不到。动物实验发现,将纯化的 CD34⁺CD123⁺ 细胞免疫缺陷植入小鼠体内可以引发小鼠急性髓性白血病,表明 CD123⁺ 是 LSC 特异性表型^[16,17]。因此,目前临床上常用 CD34⁺CD123⁺ 来标记 LSC。

本研究发现在复发的急性髓系白血病患者的骨髓细胞中,随着 CD34⁺ 细胞比例上升,CD34⁺CD123⁺ 阳性比例也逐渐上升,与缓解的急性髓系白血病患者相比,骨髓中 CD34⁺ 细胞及其 CD34⁺CD123⁺ 细胞比例升高。证明 LSC 是急性白血病发生、进展与复发的根源。通过 1 例复发的难治白血病患者化疗前后 LSC 表面相关抗原检测发现,常规化疗方案并不能消除 LSC,证实因难治、复发以及耐药的急性白血病不能治愈的原因是不能有效清除骨髓残存的 LSC。因此针对 LSC 的靶向治疗是目前临床急需解决的关键问题,与化疗方案同步应用的复方浙贝颗粒能够提高难治性急性白血病临床缓解率,并通过相关基础研究证实,其效应机制与该药物能够降白血病细胞膜耐药蛋白(Pgp,MRP)高表达、诱导细胞凋亡以及调节细胞内相关酶(GST)表达相关^[19,20]。至于该药物是否通过影响 LSC 表面抗原表达,有待进一步积累病例资料。

参考文献(References)

- [1] 张之南,沈悌.血液病诊断及疗效标准[M].第3版.北京:科学出版社,2007:103-116
Zhang Zhi-nan, Shen Ti. Standard of diagnosis and therapeutic effect of hematopathy [M]. Beijing: Science Press, 2007: 103-116
- [2] Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Cancer stem cells: biology, perspectives and therapeutic implications [M]. Stem Cells Human Dis, 2012: 1-22
- [3] Chan WI, Huntl Y. Leukemia stem cells in acute myeloid leukemia [J]. Semin Oncol, 2008, 35(4): 326-335
- [4] Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, et al. Nuclear factor- kappa B is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells[J]. Blood, 2001, 98(8): 2301-2307
- [5] Matsui W, Wang Q, Barber JP, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance [J]. Cancer Res, 2008, 68(1): 190-197
- [6] Gillet JP, Calcagno AM, Varma S, et al. Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(46): 18708-18713
- [7] De Figueiredo-Pontes LL, Pintao MC, Oliveira LC, et al. Determination of P-glycoprotein, MDR-related protein 1, breast cancer resistance protein, and lung-resistance protein expression in leukemic stem cells of acute myeloid leukemia [J]. Cytometry Part B Clin Cytom, 2008, 74(3): 163-168
- [8] Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges [J]. Nat Med, 2011, 17(3): 313-319
- [9] Ravandi F, Estrov Z. Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(2): 330-344
- [10] Knoblich JA. Mechanisms of asymmetric stem-cell divisions in development and cancer[J]. Cell, 2008, 132(4): 583-597
- [11] Jordan CT. Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells[J]. Leukemia, 2002, 16: 559-562
- [12] 赵玥,徐娟,孙雪静,等.白血病相关免疫表型与难治性急性髓细胞白血病的关系[J].标记免疫分析与临床,2010,17(4):238-241
Zhao Yue, Xu Juan, Sun Xue-jing, et al. Expression of leukemia-associated immunophenotypes on acute myeloid leukemia cells and its prognostic significance [J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2010,17(4): 238-241
- [13] 许晓东,胡翠华,常乃柏,等.成人急性髓细胞白血病免疫分型特点及临床预后分析[J].中国实验诊断学,2010,3(14):423-425
Xu Xiao-dong, Hu Cui-hua, Chang Nai-bo, et al. Clinical prognostic analysis and characteristics of immunophenotyping with adult acute myeloid leukemia [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2010, 3(14): 423-425
- [14] 程薇,马保根,翟亚萍,等.139例急性髓系白血病免疫分型特点分析[J].肿瘤防治研究,2009,36(3):235-237
Cheng Wei, Ma Bao-gen, Zhai Ya-ping, et al. Characteristic analysis of immunological classification of 139 examples acute myeloid leukemia[J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2009, 36(3): 235-237
- [15] 郑德明,杨绍娟,吴晓冬.多药耐药基因、CD34⁺的表达对急性髓细胞性白血病化疗效果的影响 [J].中国实验诊断学,2011,15(2):281-282
Zheng De-ming, Yang Shao-juan, Wu Xiao-dong. The effects of multidrug resistance gene 1 (mdr1) and CD34 expression in acute myeloid leukemia of chemotherapy [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2011,15(2): 281-282
- [16] Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells[J]. Leukemia, 2000, 14(10): 1777-1784
- [17] Gündogdu MS, Liu H, Metzendorf D, et al. The haematopoietic GT-Pase RhoH modulates IL3 signaling through regulation of STAT activity and IL3 receptor expression[J]. Mol Cancer, 2010, 25(9): 225-238
- [18] 郑智,李冬云,陈信义.复方浙贝药物血清影响 K562/A02 细胞积聚外排功能和细胞凋亡研究[J].中国中西医结合杂志,2010,30(2):170-173
Zheng Zhi, Li Dong-yun, Chen Xin-yi. Study on the compound fritillaria thunbergii miq particles to the subcellular accumulation ability and inducing apoptosis of K562/A02 cells [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2010, 30(2): 170-173
- [19] 陈信义,郑智,陈菊,等.复方浙贝颗粒联合阿霉素对 K562/A02 移植瘤细胞凋亡及相关蛋白表达的影响[J].中国实验血液学杂志,2009,17(6):1439-1442
Chen Xin-yi, Zheng Zhi, Chen Ju, et al. Analysis of the drug-combination of Compound Zhe Bei Granule(CZBG) and doxorubicin effects on the expression of Bcl-2, Bax and apoptosis ratio in K562/A02 multidrug resistance tumor xenografts [J]. Journal of Experimental Hematology, 2009, 17(6): 1439-1442
- [20] 郑智,侯丽,许亚梅,等.复方浙贝颗粒联合阿霉素影响 K562/A02 移植瘤细胞耐药相关酶表达研究[J].医学研究杂志,2009,38(12):29-31
Zheng Zhi, Hou Li, Xu Ya-mei, et al. The effects of Compound Zhe Bei Granule(CZBG) combined with doxorubicin on the expression of GST and Topo- II in K562/A02 cell line multidrug resistance tumor xenografts in mice [J]. Journal of Medical Research, 2009, 38(12): 29-31