

白血病的发生、发展和凋亡受阻密切相关,如果细胞凋亡受到抑制可致使肿瘤的发生,而人类机体内存在两类影响细胞凋亡的基因蛋白,即抗凋亡基因蛋白和促凋亡基因蛋白。研究发现,抑制凋亡作用的基因主要为凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族,c-IAP1 是 IAP 家族的一个重要成员^[1-3]。而第 2 个线粒体衍生的胱天蛋白酶激活剂(second mitochondria derived activator of caspase, Smac)是最近发现的一个促凋亡因子,它可与多种 IAP 分子相结合,促使多种肿瘤细胞凋亡^[4],并增加肿瘤细胞对放射治疗、化学治疗作用的敏感性。国内外目前关于 c-IAP1 和 Smac 的研究多限于白血病细胞株和成人白血病,对儿童急性白血病(acute leukemia, AL)的研究报道较少。本研究旨在通过检测 c-IAP1、Smac 蛋白及其 mRNA 在儿童 AL 中的表达情况,分析二者之间的关系与临床意义,进一步探讨白血病发病的可能机制,以期为儿童白血病的治疗方法提供新的途径。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 10 月至 2012 年 12 月在新乡医学院第一附属医院小儿内科住院和门诊随访的患儿 72 例,分为初诊组、缓解组和复发组。诊断依据 2006 年中华医学会儿科学分会血液学组制订的《小儿急性淋巴细胞白血病诊疗建议(第 3 次修订草案)》及《儿童急性髓细胞白血病诊疗建议》^[5-6],经临床和实验室检查确诊(骨髓细胞形态学,部分病例同时进行免疫与细胞遗传学分型)。

初诊组患儿 32 例,男 23 例,女 9 例,年龄 11 个月至 11 岁,平均(5.8 ± 1.2)岁,急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)23 例,急性髓细胞性白血病(acute myeloblastic leukemia, AML)9 例;缓解组患儿 30 例,男 20 例,女 10 例,年龄 3.3 ~ 11.8 岁,平均(7.2 ± 1.7)岁;复发组患儿 10 例,男 7 例,女 3 例,年龄 7.2 ~ 15.5 岁,平均(10.7 ± 2.0)岁。对照组患儿为同期经临床及骨髓细胞学检查排除了白血病及其他部位恶性肿瘤的血液病患儿,共 12 例,男 7 例,女 5 例,年龄 10 个月至 6 岁,平均(3.3 ± 2.2)岁。

其中白血病及对照组共 45 例患儿检测了 c-IAP1、Smac mRNA 表达。初诊组 23 例,男 14 例,女 9 例,年龄 11 个月至 9.4 岁,平均(5.3 ± 1.7)岁,ALL 16 例,AML 7 例;缓解组 12 例,男 8 例,女 4 例,年龄 3.6 ~ 11.8 岁,平均(8.3 ± 2.5)岁;对照组 10 例,男 7 例,女 3 例,年龄 10 个月至 5 岁,平均(4.5 ± 1.3)岁。

1.2 试剂及仪器 c-IAP1、Smac 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 生物工程公司,免疫组织化学染色试剂盒和二氨基联苯胺显色试剂盒购于北京中杉生物技术有限公司,TRIzol 液、琼脂糖凝胶等购于美国 Promega 公司,AMV 反转录酶、DNA ladder 等购于上海生工生物工程股份有限公司;离心机由德国 Heraeus 公司生产,DYY-III4 型电泳仪由北京六一厂生产,UV-2000 紫外投射仪由上海天能公司生产。

1.3 方法和结果判定 各组患儿抽取骨髓标本后即刻涂片,采用乙醇、乙醚混合液固定,室温干燥后于 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存;mRNA 检测标本通过采集新鲜的骨髓液 4 mL,以乙二胺四乙酸二钾(ethylenediamine tetraacetic acid dipotassium salt, EDTAK2)抗凝。实验步骤均按试剂盒说明书进行,c-IAP1、Smac 蛋白表达采用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(streptavidin-peroxidase, SP)法检测,以细胞核和(或)细胞质着色呈棕黄色或棕褐色为阳性;c-IAP1、Smac mRNA 表达情况采用半定量反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测,扩增产物电泳后在紫外透射仪下观察并照相,以相关基因与 β -actin 在相应的扩增条带处有表达为阳性。结果判定采用阳性表达率,mRNA 半定量分析以 c-IAP1、Smac 的吸光度值除以 β -actin 的吸光度值表示。

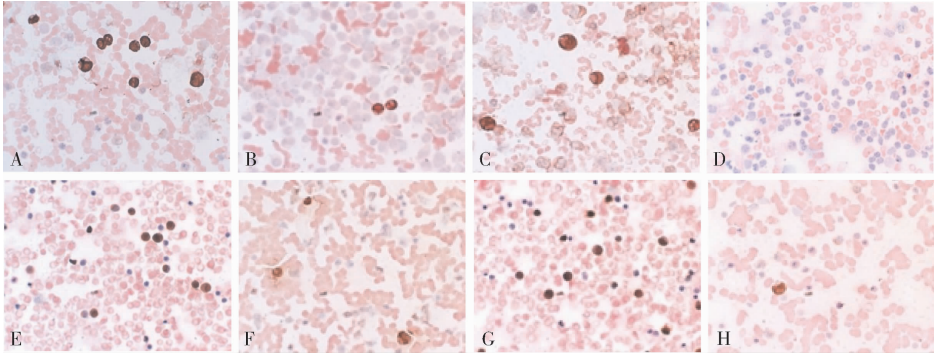
1.4 统计学处理 应用 SPSS 13.0 进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;AL 各组间及与对照组的比较采用非参数秩和检验;初诊组 AL 患儿骨髓中 c-IAP1、Smac 蛋白及其 mRNA 表达水平的相关性检验采用直线相关分析;ALL 和 AML 患儿间的比较采用两独立样本 t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$,非参数秩和检验中 4 组中两两比较时校正水准 $\alpha = 0.008$,3 组中两两比较时校正水准 $\alpha = 0.017$ 。

2 结果

2.1 c-IAP1、Smac 蛋白在各组患儿中的表达 结果见图 1、表 1。所检测标本部分表达 c-IAP1 和 Smac 蛋白,主要表现在细胞核和(或)细胞质出现棕黄色或棕褐色颗粒。二者阳性表达率在初诊组分别为 68.8% (22/32)、65.6% (21/32),缓解组分别为 26.7% (8/30)、23.3% (7/30),复发组分别为 70.0% (7/10)、70.0% (7/10),对照组分别为 16.7% (2/12)、16.7% (2/12);c-IAP1、Smac 蛋白在初诊组 AL 患儿骨髓中的表达水平显著高于缓解组($H = 19.345, 16.621, P < 0.008$)和对照组($H = 10.303, P < 0.008$);而与复发组比较差异无统计学

意义($H=0.245/3.099,P>0.008$);缓解组与对照组比较差异亦无统计学意义($H=0.939/0.543,P>$

0.008);复发组 AL 患者 cIAP1、Smac 蛋白表达水平高于对照组($H=8.324/8.324,P<0.008$)。



A:初治组 c-IAP1 蛋白;B:缓解组 c-IAP1 蛋白;C:复发组 c-IAP1 蛋白;D:对照组 c-IAP1 蛋白;E:初治组 Smac 蛋白;F:缓解组 Smac 蛋白;G:复发组 Smac 蛋白;H:对照组 Smac 蛋白。

图1 c-IAP1 和 Smac 在 AL 患儿和对照组中的表达(SP 法,×400)

Fig.1 Expression of c-IAP1 and Smac protein in AL group and control group(SP method, ×400)

表1 AL 患儿和对照组 c-IAP1、Smac 蛋白表达水平

Tab.1 Expression levels of c-IAP1, Smac protein in AL group and control group

组别	n	阳性/例		中位数		四分位数间距	
		c-IAP1	Smac	c-IAP1	Smac	c-IAP1	Smac
对照组	12	2	2	0	0	0	0
初诊组	32	22	21	39	37	54	52
缓解组	30	8	7	0	0	16	5
复发组	10	7	7	69	62	70	70

注:秩和检验:初诊组与缓解组、对照组比较 $P<0.008$;初诊组与复发组比较 $P>0.008$;缓解组与对照组比较 $P>0.008$;复发组与对照组比较 $P<0.008$ 。

2.2 c-IAP1、Smac mRNA 在各组患儿中的表达

结果见表2。所检测标本部分表达 c-IAP1、Smac mRNA,二者阳性表达率在初诊组分别为 69.6% (16/23)、65.2% (15/23),缓解组分别为 33.3% (4/12)、25.0% (3/12),对照组分别为 10.0% (1/10)、10.0% (1/10);c-IAP1、Smac mRNA 在初治组 AL 患儿骨髓中的表达水平显著高于缓解组($H=7.973/5.942,P<0.017$)和对照组($H=10.132/8.960,P<0.017$);而缓解组与对照组比较差异无统计学意义($H=2.064/1.059,P>0.017$)。

表2 AL 患儿与对照组 c-IAP1、Smac mRNA 表达水平比较

Tab.2 Comparison of mRNA levels of c-IAP1 and Smac between AL group and control group

组别	n	阳性/例		中位数		四分位数间距	
		c-IAP1	Smac	c-IAP1	Smac	c-IAP1	Smac
对照组	10	1	1	0.000	0.000	0.000	0.000
初诊组	23	16	15	0.786	0.765	0.880	0.885
缓解组	12	4	3	0.000	0.000	0.528	0.467

注:秩和检验:初诊组与缓解组和对照组比较 $P<0.017$;缓解组与对照组比较 $P>0.017$ 。

2.3 初诊组 ALL 和 AML 患儿骨髓中 c-IAP1、Smac 表达情况 结果见表3。初诊组 ALL 患儿 c-IAP1、Smac 蛋白表达水平分别为 32.36 ± 24.72 、 30.24 ± 24.72 ,高于 AML 患儿的 36.42 ± 29.23 、 $31.46\pm25.18(t=0.631/0.127,P>0.05)$;其中 23 例进行了 c-IAP1、Smac mRNA 表达水平测定,16 例 ALL 患儿分别为 0.62 ± 0.48 、 0.55 ± 0.46 ,7 例 AML 患儿分别为 0.73 ± 0.54 、 0.73 ± 0.55 ,二者比较差异无统计学意义($t=-0.482/-0.818,P>0.05$)。

表3 初诊组 ALL 与 AML 患儿 c-IAP1、Smac 蛋白和 mRNA 表达水平比较

Tab.3 Comparison of protein and mRNA expression levels of c-IAP1, Smac in ALL and AML of the newly diagnosed group ($\bar{x}\pm s$)

组别	蛋白水平			mRNA 水平		
	n	c-IAP1	Smac	n	c-IAP1	Smac
ALL	23	32.36 ± 24.72	30.24 ± 24.72	16	0.62 ± 0.48	0.55 ± 0.46
AML	9	36.42 ± 29.23^a	31.46 ± 25.18^a	7	0.73 ± 0.54^a	0.73 ± 0.55^a

注:与 ALL 比较^a $P>0.05$ 。

2.4 c-IAP1、Smac 表达水平相关性 初诊组 AL 患儿骨髓中 c-IAP1、Smac 在蛋白水平和 mRNA 水平均呈正相关($r=0.541/0.668,P<0.01$)。

3 讨论

AL 是儿童恶性肿瘤中的常见疾病,目前的联合化学治疗、造血干细胞移植及免疫治疗虽明显改善了其愈后,但部分患儿仍不能达到长期缓解或易复发,因此,进一步探讨白血病的发病机制,对寻找有效的治疗途径极为重要。而细胞凋亡抑制是肿瘤发生的重要机制,启动凋亡则可对白血病达到治疗的目的,因此,凋亡调节蛋白的表达与白血病治疗效果的关系成为新的研究热点。

研究表明机体内细胞凋亡过程受抗凋亡基因和促凋亡基因的调控,IAP 家族是近年来发现的具有抗凋亡活性的一类细胞内凋亡抑制蛋白,其成员 c-IAP1 是重要的细胞凋亡调节因子之一^[7-8],含有 BIR、Ring 及 Card 3 个结构域,其中 BIR 结构域是 c-IAP1 的重要功能区域,是其发生抑制凋亡的关键,它可与 caspase 结合,抑制其激活^[9-10]。Caspase 广泛存在于细胞中,在体内低水平表达,介导即将死亡的细胞,在细胞凋亡的启动和完成中起重要作用,是细胞凋亡的主要执行者。Smac 是由线粒体释放的一种促凋亡蛋白,可以与多种 IAP 分子结合,包括 c-IAP1、c-IAP2、XIAP 和 survivin 等^[9,11]。

本研究结果发现,c-IAP1、Smac 蛋白在初诊组 AL 患儿骨髓中表达水平高于对照组,提示 c-IAP1 和 Smac 的异常表达和儿童 AL 的发病密切相关。在经过治疗达到完全缓解后,c-IAP1、Smac 的表达水平明显下降,与对照组比较差异无统计学意义,而在 10 例复发患儿,二者的表达水平再次升高,明显高于对照组和缓解组,与初治组差异无统计学意义,说明 c-IAP1、Smac 蛋白参与了儿童 AL 的进展过程,提示可以通过对 c-IAP1 和 Smac 水平的监测来判断 AL 的病情变化,其表达水平的再增高是 AL 患儿复发的高危因素。

本研究发现初诊组 ALL 和 AML 患儿 Smac、c-IAP1 在蛋白和 mRNA 水平上差异均无统计学意义,说明二者表达水平可能与 AL 患儿的临床类型无关。

c-IAP1 的异常高表达有利于细胞逃逸生长监控,从而促进细胞的异常增殖和恶性转化,促进儿童 AL 的发生与发展。c-IAP1 的表达水平高低与化学治疗药物的疗效有关^[9],c-IAP1 高表达的肿瘤细胞对抗癌药物耐药,其作用机制是直接抑制 caspase 的活性,而通过负性调控因子的作用可以下调 c-IAP1 在恶性血液病或恶性血液细胞系的表达,以诱导 caspase 依赖的细胞凋亡,从而增加肿瘤细胞对化学治疗药物的敏感性,减少耐药。Smac 和 c-IAP1 是一种竞争性作用,c-IAP1 受到 Smac 负调控,Smac 能够与 c-IAP1 的 BIR 结构形成双价结合,释放活化的 caspase,重新恢复对免疫细胞毒性的敏感性。此外,Smac 还可以增强 IAP 泛素连接酶活性而降解 IAP 蛋白,使其水平降低^[12],如 Smac 可以选择性地使 c-IAP1 泛素化而导致其水平降低,可以通过增加 Smac 的相对浓度促进细胞凋亡。目前实验研究也证实 Smac 能制约克隆源肿瘤生长,控制肿瘤生长和转移速度,一些 Smac 的生物制品能提高免疫细胞对肿瘤细胞杀伤的敏感性^[7]。因此,凋亡抑制蛋白 c-IAP1 和其天然抑制因子 Smac 在白血病的发生、预后及耐药中具有重要作用,以 c-IAP1 和 Smac 为靶分子有望

为白血病的治疗及耐药逆转提供新的思路。

本实验研究结果发现,儿童 AL 患者骨髓中的 Smac 与 c-IAP1 在蛋白质和 mRNA 水平均呈正相关,与王晓欢等^[13]在部分肿瘤中发现 c-IAP1 在 mRNA 和蛋白水平表达上并不一致,表明转录后的翻译过程还可能受到其他因素的调节,可能因为 c-IAP1 表达水平的升高,通过某种信号的刺激而引发 Smac 表达的相应升高,以抑制 c-IAP1 过度表达。这有待于扩大样本量来进一步深入研究。

综上所述,本研究结果提示 c-IAP1、Smac 参与了儿童 AL 发生及进展过程,并且二者在此过程中相互影响,但其表达水平可能与儿童白血病临床类型无关。

参考文献:

- [1] Kenneth N S,Duckett C S. IAP proteins: regulators of cell migration and development[J]. *Curr Opin Cell Biol*,2012,24(6):871-875.
- [2] 许杨,刘芳,周兰萍,等. c-IAP1 在食管鳞癌中的表达及其对化疗敏感性的影响[J]. *世界华人消化杂志*,2011,19(11):1138-1144.
- [3] Wang K,Lin B. Inhibitor of apoptosis proteins(IAPs) as regulatory factors of hepatic apoptosis[J]. *Cell Signal*,2013,25(10):1970-1980.
- [4] Sumi H L,Yabuki M,Iwai K,et al. Antitumor activity and pharmacodynamic biomarkers of a novel and orally available small-molecule antagonist of inhibitor of apoptosis proteins[J]. *Mol Cancer Ther*,2013,12(2):230-240.
- [5] 中华医学会儿科学分会血液学组. 小儿急性淋巴细胞白血病诊疗建议:第3次修订草案[J]. *中华儿科杂志*,2006,44(5):392-395.
- [6] 中华医学会儿科学分会血液学组. 儿童急性髓细胞白血病诊疗建议[J]. *中华儿科杂志*,2006,44(11):877-878.
- [7] Fulda S,Vucic D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer[J]. *Nat Rev Drug Discov*,2012,11(2):109-124.
- [8] Grzybowska-Izydorczyk O,Cebula B,Robak T,et al. Expression and prognostic significance of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family and its antagonists in chronic lymphocytic leukaemia[J]. *Eur J Cancer*,2010,46(4):800-810.
- [9] Miura K,Fujibuchi W,Ishida K,et al. Inhibitor of apoptosis protein family as diagnostic markers and therapeutic targets of colorectal cancer[J]. *Surg Today*,2011,41(2):175-182.
- [10] 蔡增琰,潘亚文,尚银武,等. XIAP、Smac 的研究进展[J]. *中国肿瘤外科杂志*,2014,6(1):51-53.
- [11] de Almagro M C,Vucic D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy[J]. *Exp Oncol*,2012,34(3):200-211.
- [12] Kenneth N S,Duckett C S. IAP proteins: regulators of cell migration and development[J]. *Curr Opin Cell Biol*,2012,24(6):871-875.
- [13] 王晓欢,武坚锐,郝国平,等. 促凋亡基因 Smac 在急性淋巴细胞白血病患者中表达的意义[J]. *临床医药实践*,2013,22(2):110-112.

(本文编辑:徐刚珍 英文编辑:杨 博)