

儿童急性淋巴细胞白血病 p16 蛋白表达及 DNA 含量的临床研究

周文娣, 祁海啸, 胡 剑, 朱从龙, 高 健, 蒯文霞*

(南京医科大学附属淮安第一医院儿科, 江苏 淮安 223300)

[摘要] 目的:探讨儿童急性淋巴细胞白血病 p16 蛋白表达及 DNA 含量的临床意义。方法:急性淋巴细胞白血病患者 58 例作为观察组,健康儿童 58 例作为对照组,采用 SP 免疫组化法检测骨髓液中 p16 蛋白的表达水平;流式细胞术检测骨髓中白血病细胞 DNA 的含量,比较两组研究对象的差异。结果:观察组患儿 p16 阳性表达率为 37.93%,明显低于对照组的 100.00% ($P < 0.05$);观察组患儿 p16 阳性表达率与年龄、性别无明显关系 ($P > 0.05$),但肝肿大 < 4 cm 患儿的 p16 阳性表达率明显高于 ≥ 4 cm 的患儿 ($P < 0.05$),高白细胞计数与高危急性淋巴细胞白血病(HR-ALL)患儿的 p16 阳性表达率明显高于低白细胞计数与标危急性淋巴细胞白血病(SR-ALL)患儿 ($P < 0.05$)。在观察组 p16 蛋白阴性表达患儿中 DNA 异倍体发生率(66.67%)明显高于阳性表达患儿中 DNA 异倍体发生率(40.90%, $P < 0.05$)。结论:p16 蛋白在急性淋巴细胞白血病患儿的发病过程中起到重要作用,p16 蛋白缺失可能与急性淋巴细胞白血病复发相关,临床高危因素与 p16 阴性表达者 DNA 异倍体发生率升高具有相关性。

[关键词] 急性淋巴细胞性白血病;p16 蛋白表达;DNA 异倍体

[中图分类号] R733.71

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2017)04-485-03

doi:10.7655/NYDXBNS20170423

急性淋巴细胞性白血病是儿童白血病中的主要类型之一,占 75%~80%,是儿童恶性肿瘤中发病率最高的疾病^[1]。随着现代医疗技术手段的发展,急性淋巴细胞白血病患者 5 年内无事件生存几率可达 80%以上,但是仍有 20%左右的患儿出现复发,导致死亡。在对儿童急性淋巴细胞白血病的研究中发现,细胞周期失控是导致肿瘤的主要因素,p16 作为细胞周期抑制蛋白,对细胞生长和增殖具有抑制作用,p16 蛋白缺失会导致 G1/S 检查点功能低下,加速病态 DNA 的复制过程,而在急性淋巴细胞白血病患者体内 p16 基因的纯合缺失显著增加,表明 p16 蛋白与儿童急性淋巴细胞白血病的发生及发展具有一定相关性^[2]。目前,常规分子生物技术条件下,难以对基因调控序列或非编码区内基因进行有效监测,本研究通过检测蛋白表达水平分析肿瘤组织的基因功能状态,现报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象

选择 2012 年 1 月—2016 年 1 月在南京医科大

学附属淮安第一医院住院治疗的 58 例急性淋巴细胞白血病患者作为观察组,所有患儿符合急性淋巴细胞白血病的诊断标准。包括男 30 例,女 28 例;年龄 1~10 岁,平均(6.37±1.12)岁;其中初发 56 例,复发 2 例;标危急性淋巴细胞白血病(SR-ALL)27 例,高危急性淋巴细胞白血病(HR-ALL)31 例。选择同期在本院健康体检的健康儿童 58 例作为对照组,男 32 例,女 26 例;年龄 1~10 岁,平均(6.24±1.09)岁,入组标准无任何疾病,各项指标正常。两组儿童的一般资料无明显差异 ($P > 0.05$),具有可比性。本研究经医院伦理委员会批准,家长知情并签署同意书。

1.2 方法

1.2.1 p16 蛋白表达水平检测

化疗前,抽取患儿及健康儿童骨髓样本 0.2 mL,直接涂片,37℃环境下干燥,随后采用冷丙酮固定 10 min,置于-20℃冰箱中保存备检。将所有样本集中采用 SP 免疫组化染色法检测 p16 蛋白表达水平。将样本取出后,放置于 3% H_2O_2 环境中,室温条件下保存 20 min 后,在样本中依次加入 10%羊血清,一抗(鼠抗人 p16 蛋白单克隆抗体,1:50 稀释, Santa Cruz 公司,美国),生物素标记二抗(1:200 稀释)以及 SP 复合物,在样本中滴加 DAB 显色液进行显色处理,并采用苏木素复染。以淋巴瘤阳性片作为阳

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金(2014NJMU2D023)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:wen103@sina.com

性对照, PBS 液替代一抗作为阴性对照。

评判标准: 细胞核或细胞浆内着棕黄色或棕褐色的细胞即为阳性细胞, 选择 10 个典型高倍视野($\times 200$)观察, 若阳性细胞数量 $< 5\%$ 则为阴性, 阳性细胞数量 $> 5\%$ 为阳性^[3]。

1.2.2 白血病细胞 DNA 含量检测

患儿及健康儿童均取 1 mL 骨髓液样本, 常规抗凝、制备单个核细胞悬液, 将细胞数调整为 1×10^6 个/mL, 碘化丙啶荧光染色, 采用流式细胞仪进行定量分析。DNA 指数在 0.9~1.1 范围内为正常, 不在此范围内且与倍数无关则为 DNA 异倍体。

1.3 统计学方法

采用 SPSS18.0 软件进行统计分析, 计数资料以百分比表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 以 $P \leq 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 p16 蛋白表达水平比较

经 SP 免疫组化监测, 阳性表达特征棕黄色颗粒弥散于细胞浆内或覆盖细胞核, 且数量 $> 5\%$; 阴性则未着色或阳性细胞数量 $< 5\%$; 观察组患儿的阳性表达率为 37.93%, 明显低于对照组的 100.00% ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 两组 p16 蛋白阳性表达情况

组别	例数	p16 蛋白表达(例)		阳性率(%)
		-	+	
观察组	58	36	22	37.93
对照组	58	0	58	100.00

$\chi^2=49.34, P < 0.01$ 。

2.2 白血病患者 p16 表达与临床特征的关系

急性淋巴细胞白血病患儿的 p16 阳性表达率与年龄、性别无明显关系 ($P > 0.05$), 但肝肿大 < 4 cm 患儿的阳性表达率明显高于 ≥ 4 cm 的患儿 ($P < 0.05$), 高白细胞计数与 HR-ALL 患儿的阳性表达率明显高于低白细胞计数与 SR-ALL 患儿 ($P < 0.05$, 表 2)。

2.3 p16 蛋白表达与 DNA 异倍体的关系

对照组儿童未出现异倍体, 观察组出现 41 例 DNA 异倍体, 两组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 在观察组 p26 蛋白阴性表达患儿中 DNA 异倍体发生率为 80.56% (29/36), p26 蛋白阳性表达患儿中 DNA 异倍体发生率 54.55% (12/22), 两者间比较差异明显 ($P < 0.05$)。

表 2 白血病患者 p16 表达与临床特征的关系

临床特征	例数	p16+(例)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)			0.339	0.560
1~2	21	9		
$> 2 \sim 10$	37	13		
性别			0.113	0.737
男	30	12		
女	28	10		
肝肿大(cm)			13.445	< 0.001
≥ 4	31	5		
< 4	27	17		
白细胞计数($\times 10^9$ 个/L)			10.175	0.001
≥ 2.5	26	4		
< 2.5	32	18		
临床分型			9.761	0.002
SR-ALL	27	16		
HR-ALL	31	6		

3 讨论

急性淋巴细胞白血病是在儿童群体中发病率较高的一类恶性肿瘤, 严重威胁患儿的生命健康。从生物学角度来看, 儿童急性淋巴细胞白血病的发生机制主要与肿瘤细胞凋亡障碍及细胞异常增殖有关。有核细胞的细胞周期一般由多种周期素和周期素依赖激酶组成的复合物负责正向调控, 由周期素依赖激酶抑制剂进行负向调节, 同时还有一些癌症基因及抑癌基因直接参与了细胞周期的调节, 在多种因素的共同影响下达到细胞周期的稳定和平衡^[4]。而白血病患者在遗传与环境等因素的双重影响下, 患儿机体内的细胞周期发生紊乱, 细胞生长失控, 最终导致病情不断发展, 恶化。

在儿童急性淋巴细胞白血病的演变过程中, 抑癌基因失活及癌基因激活是导致细胞癌变的基础。在目前已经发现的抑癌基因中, p16 蛋白与急性淋巴细胞白血病的发生与发展具有密切相关性。p16 蛋白是由多重肿瘤抑制基因 1(MTS1)表达的蛋白, 可以通过与 CDK4 竞争性结合, 从而干扰 CyclinD1 与 CDK4 的结合; 同时, 还可以阻断周期素 D-CDK4/CDK6 复合物的形成, 抑制其活性, 进一步阻滞底物 pRb 的磷酸化, 使 pRb 与转录因子 E2F 结合, 实现在细胞 G1 期进行调节的作用, 维持细胞的有序增殖, 防止恶变^[5]。但当 p16 基因出现突变或是缺失时, p16 蛋白将无法正常表达, 会导致 G1/S 检查点功能低下, 失去对细胞生长的调控作用, 不仅导致导

致细胞生长失控, 出现过度增殖, 而且还会使得异常基因组细胞复制病态 DNA, 导致癌变发生^[6]。目前有研究结果显示多种恶性肿瘤均有 p16 蛋白失活有关。姜晗等^[7]研究发现结肠癌组织中 p16 蛋白阳性表达率低于癌旁组织; 魏璇等^[8]通过对正常宫颈组织向宫颈癌的演变过程中发现, p16 蛋白具有重要作用。

近年来, 国内外学者就 p16 蛋白与急性淋巴细胞白血病的关系进行了大量研究, 白峰岩^[9]研究发现, p16 基因突变与缺失是导致小儿急性淋巴细胞白血病的重要因素。本研究通过对 58 例急性淋巴细胞白血病患者检测发现, 其 p16 蛋白阴性表达率高达 62.07%, 阳性表达率仅为 37.93%, 远低于对照组健康儿童的阳性表达率(100%), 这与现有文献报道结果一致。本研究中有 2 例复发, 均无 p16 蛋白表达, 提示 p16 蛋白表达缺失可能与急性淋巴细胞白血病的复发具有密切相关性。另外, 本研究还发现, p16 蛋白的表达缺失与患儿肝肿大 ≥ 4 cm, 白细胞计数 $\geq 2.5 \times 10^9$ 个/L 以及 HR-ALL 等高危临床特征具有密切相关性, 应作为临床治疗的重要参考依据。DNA 是导致疾病发生的重要遗传因素, 其结构和功能的异变是导致细胞改变的重要基础。DNA 非整倍体是其出现异常的重要标志^[10], 本研究中健康儿童没有出现异倍体, 而观察组患儿中 DNA 异倍体的发生率 70.69%, 其中 p16 蛋白阳性表达率患儿中 DNA 异倍体为 54.55% 明显低于阴性患儿的 80.56% ($P < 0.05$)。其主要原因可能是由于 p16 基因的缺失, 导致 p16 蛋白表达水平改变, 调节功能减弱, 导致 DNA 异常表达, 这说明 p16 蛋白与儿童急性淋巴细胞白血病存在相关性。

此外, 苏赞彩等^[11]研究指出, p16 蛋白缺失可能会影响患儿对化疗的敏感性, 由于本研究是在化疗前对患儿进行的检测, 对其相关性未进行研究。而且, 本研究样本量较小, 对 p16 蛋白与儿童急性淋巴细胞白血病发生及复发的相关性还需大样本的进一步观察。

[参考文献]

- [1] 陈晓曦, 吴剑蓉, 万朝敏, 等. 32 例儿童复发急性淋巴细胞白血病的临床特点及随访分析[J]. 华西医学, 2015, 30(5): 885-889
- [2] 陈华英, 卢燕燕, 温 红, 等. SLC25A38 在儿童急性淋巴细胞白血病细胞中的表达 [J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(5): 1230-1234
- [3] Stock W, Johnson JL, Stone RM, et al. Dose intensification of daunorubicin and cytarabine during treatment of adult acute lymphoblastic leukemia: results of cancer and Leukemia Group B Study 19802 [J]. Cancer, 2013, 119(1): 90-98
- [4] 孟 琼, 曹 军. 儿童急性白血病骨髓 P16 和 cyclinD1 的表达 [J]. 中国热带医学, 2009, 9(6): 1026-1027
- [5] 蒲秀瑛, 于 双, 樊文博, 等. 归芪多糖对衰老细胞周期及 p53, p16 蛋白的影响 [J]. 中医药学报, 2015, 43(4): 36-38
- [6] Eckert C, Henze G, Seeger K, et al. Use of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation based on minimal residual disease response improves outcomes for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia in the intermediate-risk group [J]. J Clin Oncol, 2013, 31(21): 2736-2742
- [7] 姜 晗. P16, CyclinD1 和 CDK4 在结直肠癌组织中表达及意义 [J]. 医学与哲学, 2014, 35(2): 56-59
- [8] 魏 璇, 张一兵, 杜 雪, 等. P16 蛋白在宫颈上皮内病变及宫颈癌中的表达及意义 [J]. 实用癌症杂志, 2014, 29(3): 276-277
- [9] 白峰岩. 急性淋巴细胞白血病患者 p16 蛋白及 DNA 水平的表达及意义 [J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(20): 3418-3420
- [10] 罗世强, 范新萍, 蔡 稔, 等. 多重链接探针扩增技术在染色体非整倍体畸变诊断中的应用 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2011, 28(2): 212-216
- [11] 苏赞彩, 肖 红, 孟 琼, 等. 小儿急性淋巴细胞白血病 p16 蛋白表达及 DNA 含量与临床相关性研究 [J]. 临床儿科杂志, 2005, 23(2): 87-89

[收稿日期] 2016-11-29

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnmunjmuedu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。