

·临床研究·

急性白血病 MAGE-A3 基因表达的临床意义

黎国伟¹, 王东宁², 吴红梅¹, 许先吟¹, 罗耀光¹, 陈立¹

(1. 惠州市中心人民医院血液科, 广东 惠州 516001; 2. 中山大学附属第三医院血液科, 广东 广州 510630)

摘要: 【目的】探讨 MAGE-A3 基因在急性白血病(AL)的表达及临床意义。【方法】初发 AL 93 例, 其中急性淋巴细胞白血病(ALL)27 例, 急性髓细胞白血病(AML)66 例, 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测 MAGE-A3 基因的表达, 观察该基因表达与初治患者治疗效果关系。【结果】93 例 AL 中 MAGE-A3 基因阳性表达 45 例, 总阳性率 48.4%, 其中在 ALL、AML 的阳性率分别为 51.9% 和 47.0%, 两组比较无统计学差异。在非 M3 型 AML 患者中, MAGE-A3 表达阳性与阴性的完全缓解(CR)率分别为 64.0% 和 92.3%, 两者比较有统计学差异($P < 0.05$)。对表达阳性的 21 例 AL 治疗后 MAGE-A3 基因表达动态观察, 当获得 CR 时, MAGE-A3 表达可转阴性, 持续阳性者可早期复发; 未获 CR 者可持续表达阳性。【结论】MAGE-A3 基因在 AL 中有一定的表达, 在 AML 和 ALL 的表达率相仿。MAGE-A3 基因阳性非 M3 型 AML 治疗 CR 率较低, MAGE-A3 基因阳性表达可作为 AML 患者预后不良的一项指标。监测 MAGE-A3 基因表达变化可作为检测微小残留病的有效手段。

关键词: 急性白血病; MAGE-A3; 预后因子; 微小残留病

中图分类号: R733.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2009)02-0187-04

Expression of MAGE-A3 Gene in Acute Leukemia and Its Clinical Significance

LI Guo-wei¹, WANG Dong-ning², WU Hong-mei¹, XU Xian-yin¹, LUO Yao-guang¹, CHEN Li¹

(1. Department of Hematology, Huizhou Municipal Central Hospital, Huizhou 516001, China;

2. Department of Hematology, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】To study the expression of MAGE-A3 gene in acute leukemia and its clinical significance. 【Methods】Ninety-three newly diagnosed patients with acute leukemia (AL) including 27 acute lymphoblastic leukemia (ALL) and 66 acute myelogenous leukemia (AML). Expression of MAGE-A3 mRNA was detected in these patients by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The relationship between MAGE-A3 expression and response were analyzed. 【Results】The expression of MAGE-A3 was positive in 45 of 93 AL patients (48.4%). The positive rates of MAGE-A3 expression were 51.9% in ALL and 47.0% in AML, with no statistically significant difference. The complete remission (CR) rates were 64.0% in MAGE-A3-positive non-M3 AML patients and 92.3% in MAGE-A3-negative non-M3 AML patients, with statistically significant difference ($P < 0.05$). Twenty-one patients with positive MAGE-A3 expression were followed up to observe the changes of MAGE-A3 expression after treatment. The MAGE-A3 could turn negative after getting CR. The patients who had gotten CR could relapse earlier when the MAGE-A3 was continent positive. The MAGE-A3 positive expression did not turn negative when the patients did not get CR. 【Conclusions】MAGE-A3 expression is observed in some AL patients. The positive expression of MAGE-A3 is similar between AML and ALL. The non-M3 AML patients with positive MAGE-A3 expression got lower CR rate, which indicates that MAGE-A3 can be used as a poor prognostic factor in AML. Monitoring of the MAGE-A3 expression may be a useful means for the detection of minimal residual disease in AL.

Key words: acute leukemia; MAGE-A3 gene; prognostic factor; minimal residual disease

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2009, 30(2): 187-190]

收稿日期: 2008-10-08

基金项目: 惠州市科技计划项目(2007Y002)

作者简介: 黎国伟, 硕士, 副主任医师, E-mail: hzligw@163.com

黑色素瘤相关抗原 A3 (melanoma-associated antigen-A3, MAGE-A3) 基因是 MAGE 家族的一员,除在睾丸及胎盘中表达外,在其他正常组织中不表达,它所编码的蛋白可被细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)识别和杀伤。目前证实 MAGE-A3 基因广泛表达于原发性肝癌^[1]、结肠癌^[2]等实体肿瘤,但 MAGE-A3 基因在急性白血病(acute leukemia, AL)中的表达仅国外有个例的研究报道^[3],与 AL 治疗效果是否有关、对 AL 微小残留病(minimal residual disease, MRD)的监测是否有意义未见有文献报道。本文应用 RT-PCR 方法检测 AL MAGE-A3 基因的表达情况,并探讨其对 AL 疗效和预后判断的价值,同时也为下一步 AL 的特异性免疫治疗研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 临床资料

选择我院与中山大学附属第三医院 2003 年 6 月至 2007 年 6 月确诊初治 AL 93 例,诊断标准见张之南主编的《血液病诊断及疗效标准》^[4]。男 57 例,女 36 例,年龄 14 ~ 65 岁,平均年龄 31.4 岁,其中 AML 66 例,ALL 27 例。完成常规化疗 2 疗程以上可供疗效评估的初治非 M3 型 AL 病例 78 例,其中急性淋巴细胞白血病(ALL) 27 例,急性髓细胞白血病(AML) 51 例。取健康体检者 16 例外周血作为正常对照,男 10 名,女 6 名,年龄 17 ~ 61 岁,平均年龄 33 岁。

临床治疗方案:ALL 患者采用 VDLP (长春新碱、柔红霉素、左旋门氨酰胺酶、泼尼松或 VDCP(长春新碱、柔红霉素、环磷酰胺、泼尼松)方案进行诱导缓解治疗;AML 患者采用 DA(柔红霉素、阿糖胞苷)方案进行诱导缓解。完成 2 个疗程后进行疗效统计。疗效标准参照《血液病诊断与疗效标准》^[4]。

1.2 细胞系

人白血病细胞株 K562 细胞作为阳性对照,购自中山大学动物实验中心。

1.3 主要试剂

TRIzol 总 RNA 提取液为美国 GIBCO 公司产品;逆转录试剂盒及 TaqDNA 聚合酶为上海生物工程公司生产。

1.4 引物

引物由北京鼎国生物工程公司合成:MAGE-

A3 上游引物,5'-TGGAGGACCAGAGGCCCCC-3'; MAGE-A3 下游引物,5'-GGACGATTATCAGGAGGCCTGC-3'。

1.5 方法

1.5.1 分离单个核细胞 肝素抗凝采集患者新鲜骨髓或健康体检者外周血加入淋巴细胞分离液中,常规分离单个核细胞。

1.5.2 总 RNA 抽提和逆转录反应 按试剂说明书操作。

1.5.3 PCR 反应 MAGE-A3 与内参照 β 2-MG 分开扩增。扩增条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 45 s,59 °C 退火 50 s,72 °C 延伸 45 s,35 个循环后,72 °C 延伸 7 min。同时作阳性对照(K562 细胞株)。MAGE-A3 基因预期扩增长度 725 bp,内参照 β 2-MG 预期扩增产物长度为 370 bp。

1.5.5 PCR 产物分析 取 MAGE-A3 与 β 2-MG PCR 产物各 5 μ L 混匀后在 20 g/L 琼脂糖凝胶上电泳(100 V) 50 min,溴乙锭(EB)染色后 GDS800 数码凝胶分析仪分析。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件进行 χ^2 检验或四格表精确概率法分析。

2 结果

2.1 健康体检者 MAGE-A3 基因的表达

全部 16 例健康体检者外周血未检出 MAGE-A3 基因的表达。

2.2 AL 患者 MAGE-A3 基因的表达

93 例 AL 中 MAGE-A3 基因表达阳性 45 例,阳性率为 48.4%。见图 1。其中 66 例 AML 中表达阳性 31 例,阳性率为 47.0%;27 例 ALL 中 14 例阳性,阳性率为 51.9%,两种急性白血病 MAGE-A3 基因表达阳性率无统计学差异($\chi^2 = 0.183$, $P = 0.669$)。各型 AML MAGE-A3 表达见图 1、表 1。

2.2 MAGE-A3 表达与 AL 化疗疗效观察

可评估疗效的非 M3 型 AL 78 例,MAGE-A3 基因表达阳性 39 例,阴性 39 例。MAGE-A3 表达阴性 39 例中 CR 36 例,CR 率达 92.3%,MAGE-A3 阳性表达 39 例中 CR 24 例,CR 率为 61.5%,两组疗效比较差值较大,为 30.8%($\chi^2 = 10.4$, $P = 0.001$)。对不同类型 AL 患者的疗效观察结果见表 2。

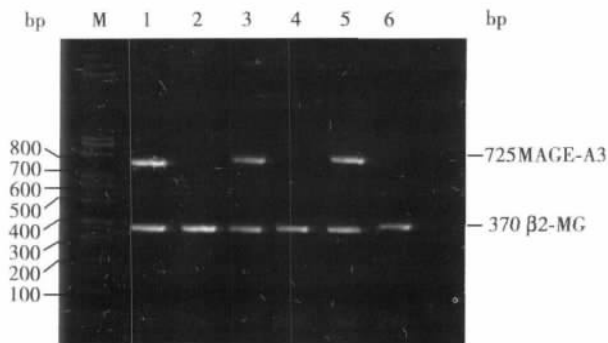


图 1 MAGE-A3 表达电泳图

Fig.1 Electrophoregram of MAGE-A3 expression

Lane M: standard marker; Lane 1: K562 cell line; Lane 2: healthy people; Lane 3, 5: MAGE-A3 positive samples; Lane 4, 6: MAGE-A3 negative samples

表 1 急性髓细胞白血病 MAGE-A3 基因表达

Table 1 MAGE-A3 expression in acute myelogenous leukemia (AML) subtypes

Subtype	n	MAGE-A3 positive	MAGE-A3 positive (%)
M1	6	1	16.7
M2	28	17	60.7
M3	15	6	40
M4	8	4	50
M5	8	3	37.5
M6	1	0	0

表 2 MAGE-A3 基因表达与不同类型白血病的疗效关系

Table 2 Relationship between MAGE-A3 expression and response in AL subtypes

Subtype	MAGE-A3 positive		MAGE-A3 negative		χ^2	P
	n	CR (%)	n	CR (%)		
AML	25	16(64.0)	26	24(92.3)	6.037	0.014
ALL	14	8(57.1)	13	12(92.3)		0.077

AML: acute myelogenous leukemia; ALL: acute lymphoblastic leukemia

2.3 随访

治疗前 MAGE-A3 基因阳性表达的 13 例 AML 中 9 例获得 CR, 2 例部分缓解(PR)。CR 的 9 例患者有 7 例基因表达转阴性, 2 例 PR 患者基因表达持续阳性。

治疗前 MAGE-A3 基因表达为阳性 8 例 ALL 中 4 例治疗后获 CR, 1 例部分缓解(PR)。PR 的患者 MAGE-A3 基因持续阳性; 4 例 CR 的患者 2 例转阴性, 2 例为弱阳性, 后者分别在获得缓解 1 个月和 3 个月后复发。

3 讨论

AL 是血液系统中发病率最高的恶性肿瘤, 虽然治疗药物和手段不断完善和发展, 初治 AL 完全缓解率可达到 80%左右, 但缓解后复发率极高^[5,6]。因此有必要寻找一种可判断治疗效果、预后和追踪复发的基因标志物, 希望根据此标志物在患者不同病期的变化情况及时调整治疗方案, 改善其远期生存。

MAGE-A3 基因被认为是一种肿瘤特异性抗原基因, 在不同组织来源、不同病例类型的肿瘤中有不同程度的表达, 但在除睾丸和胎盘之外的正常组织和良性肿瘤中不表达。本研究采用 RT-PCR 方法观测 93 例 AL, 结果 MAGE-A3 基因表达阳性 45 例, 阳性率为 48.4%。在 ALL、AML 的阳性率分别为 51.9%和 47.0%, 高于 Martinez A^[3]的实时定量 PCR 方法检测的 37.7%及 29.4%的结果, 两者差别可能与检测方法、阳性判定标准的不同以及种群差异有关。我们的观察也发现在 FAB 分型的 M2、M4 型 AML 也有较高的表达率, 在健康体检者外周血未检出 MAGE-A3, 这为 MAGE-A3 作为泛 AL 免疫治疗的靶点成为可能。但这些结果是基于转录水平的研究, 以后还需进一步应用蛋白印迹方法观察该基因在蛋白水平的表达情况。

MAGE-A3 基因异常表达与恶性肿瘤病情进展以及治疗反应的关系, 已有一些报道^[7]。Sienel 等^[8]对 204 例 / 期非小细胞肺癌的多中心研究, 检测手术标本中 MAGE-A3 的阳性表达率为 39.2%, 更有意义的是, 99 名 / 期患者肿瘤中的表达阳性率为 49.5%, 显著高于 105 名 / 期患者的 29.5% ($P < 0.01$), 认为在非小细胞肺癌中, MAGE-A3 表达水平增高可能与疾病分期进展存在相关性。MAGE-A3 基因表达与 AL 治疗效果是否有关, 尚未见报道。本组非 M3 型 AL 病人 MAGE-A3 表达阴性者, 治疗可获得较高的 CR 率, 达到 92.3%, 而 MAGE-A3 阳性表达患者的治疗 CR 率较低, 仅有 61.5%, 两者差异较大。进一步分析显示在 AML 中 MAGE-A3 阳性表达患者的 CR 率明显低于 MAGE-A3 阴性表达者, 可见 MAGE-A3 表达阳性的 AML 患者治疗效果欠佳, 提示 MAGE-A3 表达阳性可作为预测 AML 病人预后不良的一项分子生物学指标。而对于 ALL 患者, 虽然表面数据显示 MAGE-A3 阳性表达与否对 CR 率影响较大(分别为

57.1%与92.3%),但并无统计学意义,可能与病例数较少有关,有待于继续收集病例做进一步分析。

AL复发的根源主要在于患者体内残存的白血病细胞,即MRD。研究已表明AML1/ETO、PML/RAR α 等融合基因可用于检测相应AL的MRD^[9,10],但受到白血病类型的限制。由于本研究结果显示MAGE-A3基因在AL尤其在AML的M2和M4亚型有较高的阳性表达率,因而观察MAGE-A3基因在AL的表达对急性白血病MRD的检查可能有较大的临床意义。本研究还发现,AL患者获得CR时,MAGE-A3表达可转阴性;未获CR的患者MAGE-A3可持续表达阳性;而在获得CR后MAGE-A3表达仍为阳性者可能早期复发。因此检测MAGE-A3基因的表达,可以作为监测AL化疗后体内残留的MRD的有用手段。

参考文献:

- [1] Luo G, Huang S, Xie X, et al. Expression of cancer-testis genes in human hepatocellular carcinomas [J]. *Cancer Immun*, 2002, 2: 11.
 - [2] Li M, Yuan YH, Han Y, et al. Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(5):1809-1814.
 - [3] Martinez A, Olarte I, Mergold MA, et al. mRNA expression of MAGE-A3 gene in leukemia cells [J]. *Leuk Res*, 2007, 31(1):33-37.
 - [4] 张之南,沈 悌. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 2版. 北京:科学出版社, 1998.168-218.
 - [5] 陈 纯,方建培,黄绍良,等. SUMS99 方案治疗儿童急性淋巴细胞白血病的长期疗效 [J]. *中山大学学报医学科学版*, 2007, 28(2):219-213.
 - [6] 秘营昌,卞寿庚. 急性白血病治疗的新策略 [J]. *新医学*, 2004, 35(07):391-392.
 - [7] 肖 刚,张文敏,张 萌,等. MAGE-3 基因的表达、纯化及其抗血清的制备 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(02):176-179.
 - [8] Sienel W, Varwerk C, Linder A, et al. Melanoma associated antigen (MAGE) A3 expression in Stages I and II non small cell lung cancer: results of a multi-center study [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2004, 25(1):131-134.
 - [9] Nucifora G, Larson RA, Rowley JD. Persistence of the 8; 21 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in long-term remission [J]. *Blood*, 1993, 82(3):712-715.
- (编辑 孙慧兰)
-
- (上接第186页 from page 186)
- [4] Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, et al. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells [J]. *Nature*, 2006, 441(7092):475-482.
 - [5] Yang J, Liu J, Zheng J, et al. A reappraisal by quantitative flow cytometry analysis of PTEN expression in acute leukemia [J]. *Leukemia*, 2007, 21(9):2072-2074.
 - [6] Weng LP, Brown JL, Eng C, et al. PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositol-3-kinase/Akt-dependent and independent pathways [J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(3):237-242.
 - [7] Aref S, Mabed M, El-Sherbiny M, et al. Cyclin D1 expression in acute leukemia [J]. *Hematology*, 2006, 11(1):31-34.
 - [8] Jaroslav P, Martina H, Jirf S, et al. Expression of cyclins D1, D2, and D3 and Ki-67 in Leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2005, 46(11):1605-1612.
 - [9] Liu JH, Yen CC, Lin YC, et al. Overexpression of cyclin D1 in accelerated-phase chronic myeloid leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2004, 45(12):2419-2425.
 - [10] Zolota V, Sirinian C, Melachrinou M, et al. Expression of the regulatory cell cycle proteins p21, p27, p14, p16, p53, mdm2, and cyclin E in bone marrow biopsies with acute myeloid leukemia. Correlation with patients' survival [J]. *Pathol Res Pract*, 2007, 203(4):199-207.
 - [11] 张继红,梁力健,黄洁夫,等. 三羟异黄酮上调肝细胞 HepG2 细胞 PENT 基因的表达及其诱导凋亡作用 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(3):285-288.
 - [12] 王鸿鹤,朱孝峰,谢冰芬,等. 人细胞周期蛋白 D1 及细胞周期蛋白激酶 CDK4 的原核表达及鉴定 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2003, 24(5):444-447.
 - [13] Lee KW, Kim HJ, Lee YS, et al. Acteoside inhibits human promyelocytic HL-60 leukemia cell proliferation via inducing cell cycle arrest at G₀/G₁ phase and differentiation into monocyte [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(9):1928-1936.
 - [14] Siitonen T, Koistinen P, Savolainen ER, et al. Increase in Ara-C cytotoxicity in the presence of valproate, a histone deacetylase inhibitor, is associated with the concurrent expression of cyclin D1 and p27 (Kip1) in acute myeloblastic leukemia cells [J]. *Leuk Res*, 2005, 29(11):1335-1342.
- (编辑 孙慧兰)