

HLX 基因在 AML 中的表达及预后分析

朱夏吟 应丽梅 朱 敏 陈葆国 罗文达

摘要 目的 分析 H2.0 样同源盒基因 (H2.0-like homeobox gene, HLX) 在急性髓系白血病 (acute myelogenous leukemia, AML) 患者中的临床表达情况, 探究 HLX 基因与 AML 疾病预后的关系。方法 收集 56 例 AML 患者的骨髓单个核细胞, 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 HLX 的表达水平, 并结合预后基因进行分析。结果 在临床初发的 AML 患者中, HLX 的表达水平高于正常人 ($P < 0.01$), HLX 表达水平与白血病患组患者年龄、骨髓原始细胞数显著相关 ($P < 0.05$), HLX 表达水平与染色体核型代表的预后分层无明显关联 ($P > 0.05$)。结论 HLX 基因在 AML 患者中的表达水平是上调的, 可能拥有独立的预后信息, 是 AML 中潜在的干预靶点。

关键词 HLX 基因 AML 骨髓单个核细胞 预后

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.07.017

Expression of HLX Gene in Acute Myeloid Leukemia and Its Prognostic Analysis. Zhu Xiayin, Ying Limei, Zhu Min, et al. Department of Hematology of Affiliated Taizhou Hospital, Wenzhou Medical College, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To analyze the expression of HLX gene in acute myeloid leukemia (AML), and to further analyze the relationship between HLX gene and prognosis. **Methods** The expression level of HLX was detected by qRT-PCR in bone marrow mononuclear cells which collected from 56 patients with AML, and the prognosis of patients was analyzed. **Results** The expression of HLX gene in AML patients was significantly higher than that in normal people ($P < 0.01$). And it was significantly correlated with age and bone marrow primitive cells ($P < 0.05$). What's more, there was no correlation between HLX expression and the prognosis of chromosome karyotype ($P > 0.05$). **Conclusion** The expression of HLX gene in AML patients is up-regulated and may have independent prognostic information, which is a potential target for intervention in AML.

Key words HLX gene; AML; Bone marrow mononuclear cells; Prognosis

急性髓系白血病 (acute myelogenous leukemia, AML) 是临床极为常见的髓系造血干细胞恶性疾病之一。研究显示, 60 岁以下 AML 患者完全缓解率为 70% ~ 80%, 但 5 年总体生存率只有 40% ~ 45%; 而年龄较大的患者, 即使体能状况良好, 其完全缓解率更低, 仅为 40% ~ 50%, 且中位生存期不足 1 年^[1]。近年来, 科学家们为寻找 AML 的发病机制不断努力, 但尚未能窥其真谛。因此, 深入研究 AML 发病机制, 寻找新的治疗靶点, 开发高效的靶向治疗药物, 对进一步提高急性髓系白血病的治疗水平具有重要的科学意义。II 类同源盒基因 HLX 于 1991 年由 Allen 等首先发现, 位于 1q41 ~ q42.1, 其开放阅读框长 1467bp, 人类 HLX 基因又称为 HLX1 或 HB24, 鼠 HLX 基因称为 Hlx^[2]。有研究表明, HLX 基因在

CD34⁺ 造血干/祖细胞的初始状态中表达水平较高, 然而随着其分化水平增加, HLX 的表达水平逐渐下调, 表明 HLX 在保持原始分化水平上具有决定性意义; HLX 基因在 AML 患者的骨髓细胞中 mRNA 呈高表达, 提示 HLX 可能是 AML 的潜在治疗靶点; HLX 的高表达与 AML 患者的不良预后正相关, 具体机制不明确^[2,3]。本研究将通过分析初治 AML 患者不同 FAB 亚型的骨髓单个核细胞中的 HLX 基因表达水平, 结合临床病例资料, 探讨 HLX 基因与 AML 预后的关系。

对象与方法

1. 对象: 选取 2014 年 12 月 ~ 2016 年 9 月在温州医科大学附属台州医院血液肿瘤内科首次收治并自愿捐献骨髓标本的 AML 初治患者, 共 56 例。该实验已通过笔者医院伦理委员会审批。(1) 入选标准: 病例组: 根据 2008 年世界卫生组织血液肿瘤分类诊断标准明确诊断为 AML, 并根据急性白血病法、美、英 (FAB) 分型诊断标准确定亚型。对照组: 同期笔者医

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2014KYB309、2017KY709)

作者单位: 317000 临海, 温州医科大学附属台州医院

通讯作者: 罗文达, 主任医师, 电子信箱: luowd@enzemed.com

院健康体检者外周血,性别、年龄分布范围相匹配。(2)排除标准:排除其他肿瘤及免疫相关性疾病,如冠心病、糖尿病、炎性肠病等。

2. 仪器、试剂:小型高速离心机购于德国 Eppendorf Biophotometer、压力蒸汽灭菌器购于上海一恒科技有限公司、ABI 7500 实时荧光定量仪购于美国 Applied Biosystems、PCR 仪购于美国 Bio-Rad 公司、电泳仪购于美国 Bio-Rad 公司。Ficoll 淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品有限公司,TRIzol® Reagent、RNAlater® RNA Stabilization Solution、SYBR Green 购于美国 Life Technologies 公司。

3. HLX 基因相关表达量的测定:将初发 AML 患者的骨髓液 2ml 进行实验,用 Ficoll 法处理细胞,保存于 -80°C ,备用;将细胞离心,根据 Trizol 说明书添加试剂进行总 RNA 提取,加入 $20\mu\text{l}$ DEPC- H_2O 溶解 RNA。按 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA,严格按照顺序加入试剂合成 cDNA,冰上冷却并离心,并严格按照剂量加入 10mmol/L dNTP Mix $2\mu\text{l}$ 、RiboLock Rnase Inhibitor $1\mu\text{l}$ 、Reaction Buffer $4\mu\text{l}$ 、RevertAid M-MuLV RT $1\mu\text{l}$,混匀离心。根据 GenBank 中人 HLX 基因序列,设计 HLX 上游引物:5'-ATCTCACTTCCCTGCTAACCG-3',HLX 下游引物:5'-AGAAGCCTCGTTAATGGGATCT-3',将上海捷瑞生物购入的 GAPDH 管家基因作为内参,hGAPDH 上游引物:5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3',hGAPDH 下游引物:5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3',按照实时定量 PCR 反应体系严格按照反应条件进行实验,均设 3 个平行反应孔,PCR 八联管中加入反应体系,进行 PCR 反应,得出图片及数值,进一步分析溶解曲线及 Ct 值;HLX 基因的 Ct 值由管家基因 GAPDH 的 Ct 值标准化;采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行相关数据的处理。

4. 统计学方法:采用 SPSS 22.0 统计学软件对数据进行统计分析。使用 $K-S$ 检验分析数据正态性,AML 患者组内性别、年龄、WBC、骨髓原始细胞水平分层例数与 HLX 高表达例数的比较用 χ^2 检验,HLX 与临床指标的相关性采用多元线性相关分析,定量资料组间差异比较采用两独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. HLX 基因在初发的 AML 患者中普遍呈高表达:项目组在观察期内共收集 56 例 AML 初治患者,患者平均年龄 46.4 岁,中位年龄 56 岁(34~76 岁),

其中男性 23 例,中位年龄 60 岁(34~76 岁),女性 33 例,中位年龄 48 岁(38~65 岁),根据 FAB 标准分型,急性粒细胞白血病未分化型(M1)10 例,急性粒细胞白血病部分分化型(M2)10 例,急性早幼粒细胞白血病(M3)24 例,急性单核细胞白血病(M5)11 例,急性红白血病(M6)1 例。健康对照组 20 例,经统计,AML 实验组与同期健康对照组的一般资料,如性别、年龄等均具有可比性($P > 0.05$)。实验组中初治 AML 患者的骨髓单个核细胞中 HLX 基因表达量中位值为 3.79(0.01~24.70),对照组中健康人外周血中 HLX 基因表达量中位数为 1.25(0.00~11.50), $P < 0.01$,即 AML 初治患者 HLX 基因表达量高于对照组。

2. AML 患者中 HLX 表达量与临床指标的关系:初治 AML 患者组内比较,性别、年龄的 P 值分别为 0.18、0.02,即性别差异无统计学意义,年龄差异有统计学意义。HLX 基因表达水平与骨髓原始细胞比例呈正相关($r = 0.43$, $P < 0.05$),与白细胞计数($r = -0.55$, $P > 0.05$)、血小板($r = 0.61$, $P > 0.05$)、血红蛋白($r = 0.66$, $P > 0.05$)无相关性。见表 1。

表 1 AML 初治患者 HLX 高表达率与临床指标的关系[n(%)]

临床指标	n	HLX 高表达例数	χ^2	P
性别				
男性	23	12(52.2)	1.78	0.18
女性	33	23(69.7)		
年龄(岁)				
≥ 60	21	9(42.9)	5.53	0.02*
< 60	35	26(74.3)		
WBC($\times 10^9/\text{L}$)				
≥ 20	19	9(47.4)	2.81	0.09
< 20	37	26(70.3)		
PLT($\times 10^9/\text{L}$)				
≥ 100	31	15(48.3)	3.55	0.08
< 100	25	18(72.0)		
HB(g/L)				
≥ 90	34	13(41.2)	4.67	0.07
< 90	22	15(68.2)		
骨髓原始细胞数量				
≥ 50	52	35(67.3)	7.18	0.00**
< 50	4	0(0)		

临床指标的界定参照相关文献[4];HLX 高表达率的界定:分析 qRT-PCR 值,当实验组 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} >$ 对照组 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 时视为高表达,对照组计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 时取同期健康体检者 ΔCt 中位数^[3]。以上各组中分组分别赋值为 0/1,采用 χ^2 检验,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3. AML 患者中 HLX 表达量与亚型的关系:AML/M2 亚型患者 HLX 表达量中位值为 0.18

(0.11 ~ 1.16), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); AML/M3 亚型患者的 HLX 表达量中位值为 10.10 (5.04 ~ 11.01), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); AML/M5 亚型患者的 HLX 表达量中位值为 3.79 (0.44 ~ 24.70) 差异有统计学意义 ($P < 0.04$)。即 AML/M3 亚型、AML/M5 亚型患者的骨髓单个核细胞 HLX 基因表达量高于对照组, 详见表 2。

表 2 AML 初治患者各亚型 HLX 表达量与对照组比较			
白血病类型	n	HLX 表达量	P
AML/M1	10	0.20 ± 0.14	0.00**
AML/M2	10	0.34 ± 0.43	0.00**
AML/M3	24	8.88 ± 2.53	0.00**
AML/M5	11	5.45 ± 1.67	0.04*
AML/M6	1	-	-
合计	56	4.97 ± 1.10	0.00**

HLX 表达量为 AML 患者骨髓单个核细胞 HLX 基因的 qRT-PCR 的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值 (均数 ± 标准差), 对照组计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 时取对照组 ΔCt 中位数, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4. AML 患者中 HLX 表达量与预后的关系: 病例组为 56 例初治 AML 患者, 其中 20 例患者因相关原因未行染色体核型相关的细胞遗传学危险度分组, 也未行对预后具有指导意义的基因突变相关检测, 故未计入统计, 余 36 例患者均进行了危险度分层统计。依据染色体核型判断准则分类^[5], 预后良好组 7 例, 包括 3 例 t (15;17), 2 例 t (8;21), 2 例 inv (16), HLX 高表达率 57.1%; 预后中等组 21 例, 包括正常核型和其他的染色体异常, HLX 高表达率 66.7%; 预后差组共 8 例, 其中 2 例涉及 11q23, 2 例 t (9;22), 1 例 5q-, 3 例复杂核型异常, HLX 高表达率 62.5%。3 组间比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.26, P > 0.05$)。见表 3。

表 3 AML 初治患者 HLX 高表达率与 SWOG 染色体核型的关系 [n (%)]				
SWOG 染色体核型	n	HLX 高表达例数	χ^2	P
预后良好	7	4 (57.1)	1.26	0.53
预后中等	21	14 (66.7)		
预后差	8	5 (62.5)		

HLX 高表达率的界定: 分析 qRT-PCR 值, 当实验组 $2^{-\Delta\Delta Ct} >$ 对照组 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 时视为高表达^[3]。3 组间比较采用 χ^2 分析, $P > 0.05$

讨 论
AML 是一种骨髓恶性造血疾病, 其分子生物学

机制十分复杂, 并且临床表现可呈现多样性, 5 年生存率不容乐观^[6]。近年来, 同源盒基因逐渐在免疫相关的肿瘤学疾病中展露头角, 研究者初步判断其作为潜在分子靶标, 可在多种疾病中发挥确切的作用, 如同源盒基因 (homeobox gene, HOX) 关联于乳腺癌和卵巢癌^[7]。另外, Stadler 等^[8] 已证实 HOX 在造血干/祖细胞中发挥功能, 并在白血病细胞增殖、转换方面作用显著。相关研究表明, HOX 可协同辅助因子启动特定的信号通路/级联反应来调节细胞的增殖/分化参与白血病形成^[9]。近年来 II 类同源盒基因 HLX 逐渐成为了研究热点。HLX 是一种新型 II 类 HOX, 首次在小鼠的 B 细胞分离得到, 1991 由 Allen 等命名为 HLX。Liu 等^[10] 发现过表达 HLX 可抑制幼稚原始的正常功能, 使肿瘤原始细胞的集落形成能力增加, 并能增加祖细胞的分化能力。Isabel 等^[11] 发现 HLX 表达异常也与先天性膈疝 (CHD) 等出生缺陷有关, 其基因缺失常导致胚胎死亡。Fröhling^[12] 提出造血干/祖细胞上 HLX 基因的丢失不一定直接介导细胞凋亡或坏死。诸多研究表明, HLX 作为一种新型的 HOX, 极有可能是白血病的潜在干预靶点, 但其具体作用方式和作用机制仍不明确, 需要进一步研究。

Pandolfi 等^[13] 发现 II 类同源盒基因 HLX 在数个大的、独立人群的 AML 患者的数据集中高表达水平与不良预后有着强烈相关。更进一步说, HLX 跨越不同地区、种族患者的预测价值更加有意义。Yamakawa 等^[5] 和 Pandolfi 等^[14] 定义了 HLX 在多变量模型中作为一个独立的预后因素存在, 其过表达和沉默的研究表明 HLX 调控了一个特定的基因子集的表达, 被称为“HLX 标记”。Prahst 等^[15-17] 提出 HLX 是早期肿瘤发病的一个关键基因子集, 这可能是一个与以往已知的领域有着不同的生物学特征和临床结果的关键基因集。Kawahara 等^[3] 发现并提出 HLX 基因在 87% AML 患者中高表达, 并且 HLX 的过表达导致无限序列克隆的髓系祖细胞的形成, 从而进一步提出 HLX 基因可能能够决定 AML 患者的临床亚型, 但是目前并没有明确的证据提示其可以引起白血病亚型上的转换, 单单上调 HLX 基因可能不足以使亚型发生转变, 但特定的辅酶因子也许可以赋予 HLX 特异性, 有助于白血病亚型转换。

本研究通过收集初治 AML 患者的骨髓标本, 检测其单个核细胞中 HLX 基因表达量, 与同期健康体检者作为对照组的外周血中的 HLX 表达量比较, 发现 AML/M3 亚型、AML/M5 亚型 AML 患者骨髓单个

核细胞 HLX 基因表达水平较高,与 Kawahara 等^[3]的研究结果趋势一致。Kawahara 等^[3]通过分析美国大数据集里详细记录的 354 例 AML 患者的基因表达数据,发现 HLX 基因在 87% 的 AML 患者中是过表达的,这种过表达现象在 AML 不同亚型中均有发现,并且在 AML/M4 亚型和 AML/M5 亚型中尤为显著。笔者的研究不仅验证了汉族人群中初发 AML 患者中 HLX 基因的表达水平总体升高,还证实了 AML 不同亚型中 HLX 有不同的升高趋势。

另外,本实验经统计发现 AML 患者中的 HLX 表达量与骨髓原始细胞数有关,而预后良好组、预后中等组、预后差组的病例中 HLX 表达水平差异无统计学意义,即本实验无法证明 HLX 与 AML 的 SWOG 标准预后基因有联系。Nambiar 等^[18]证实,FLT3WT、NPM1、CEBPA 突变者,普遍 HLX 高表达,长期生存率下降,FLT3WT 多提示临床预后差,而 NPM1、CEBPA 突变者多提示临床预后佳,故说明 HLX 可能拥有独立的预后信息,这将是临床工作者新的研究方向。但就目前的研究水平而言,HLX 的表达水平与亚型转换的关系,HLX 与预后的关系均需进一步的研究证实。

综上所述,HLX 可能是 AML 的一个潜在干预靶点,可能在白血病的发生、发展过程中有重要的生物学意义,其表达水平或许可以用来预测临床结果和发展风险分层。但 HLX 在 AML 中的作用方式及具体调控机制尚不明确,有待于今后深入研究。

参考文献

- Villgran V, Agha M, Raptis A, *et al.* Leukapheresis in patients newly diagnosed with acute myeloid leukemia[J]. *Transfusion Apheresis Sci*, 2016, 55(2):216 – 220
- Liu T, Chen J, Xiao S, *et al.* H2.0 – like homeobox 1 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(5):6419 – 6428
- Kawahara M, Pandolfi A, Bartholdy B, *et al.* H2.0 – like homeobox regulates early hematopoiesis and promotes acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(2):194
- Döhner H, Estey EH, Amadori S, *et al.* Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net[J]. *Blood*, 2010, 115(3):453
- Yamakawa T, Sato Y, Matsumura Y, *et al.* Screening of human cDNA library reveals two differentiation – related genes, HHEX and HLX, as promoters of early phase reprogramming toward pluripotency[J]. *Stem Cells*, 2016, 34(11):2661 – 2669
- Schmidt S. Short overview on the current treatment of chronic myeloid leukemia in chronic phase[J]. *Memo*, 2016, 9(4):157 – 162
- Collins CT, Hess JL. Role of HOXA9 in leukemia: dysregulation, cofactors and essential targets[J]. *Oncogene*, 2015, 35(9):1090 – 1098
- Stadler CR, Vegi N, Mulaw MA, *et al.* The leukemogenicity of Hoxa9 depends on alternative splicing. [J]. *Leukemia*, 2014, 28(9):1838 – 1843
- Imren S, Heuser M, Gasparetto M, *et al.* Modeling de novo leukemogenesis from human cord blood with MN1 and NUP98HOXD13. [J]. *Blood*, 2014, 124(24):3608
- Liu T, Chen J, Xiao S, *et al.* H2.0 – like homeobox 1 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(5):6419 – 6428
- Isabel C V, Sabina I, Kathrin S, *et al.* TBX21 and HLX1 polymorphisms influence cytokine secretion at birth[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1):e31069
- Fröhling S. Widespread over – expression of the non – clustered homeobox gene HLX in acute myeloid leukemia[J]. *Haematologica*, 2012, 97(10):1453
- Pandolfi A, Steidi U. HLX in AML: novel prognostic and therapeutic target[J]. *Oncotarget*, 2012, 3(10):1059 – 1060
- Pandolfi A, Stanley R F, Yu Y, *et al.* PAK1 is a therapeutic target in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome[J]. *Blood*, 2015, 126(9):1118 – 1127
- Praht C, Kasaai B, Moraes F, *et al.* The H2.0 – like homeobox transcription factor modulates yolk sac vascular remodeling in mouse embryos[J]. *Arteriosclerosis Thrombos Vascular Biol*, 2014, 34(7):1468
- Garcia, Luis F. Variants in the IFN gamma transcription factor genes TBET, STAT1, STAT4, ;and HLX and the risk of pulmonary tuberculosis in a Colombian population: a case – control study[J]. *Biomed Revist Del Instituto Nacional De Salud*, 2013, 33(2):259 – 267
- Li X, Liang W, Ye H, *et al.* Overexpression of Indian hedgehog partially rescues short stature homeobox 2 – overexpression – associated congenital dysplasia of the temporomandibular joint in mice[J]. *Mol Medi Rep*, 2015, 12(3):4157 – 4164
- Nambiar RK, Narayanan G, Prakash NP, *et al.* Blood group change in acute myeloid leukemia[J]. *Proc*, 2017, 30(1):74 – 75

(收稿日期:2017 – 09 – 22)

(修回日期:2017 – 10 – 25)