

巨幼红细胞性贫血患者血浆维生素 B9 和维生素 B12 水平对骨髓组织 p53 表达的影响研究

张 蓉¹, 李国辉², 王 颖¹, 刘 赞¹, 赵会迎¹, 梁英民¹

(1. 西安高新医院血液科, 西安 710065; 2. 空军军医大学唐都医院血液科, 西安 710038)

摘要: 目的 探究巨幼红细胞性贫血 (megaloblastic anemia, MBA) 患者血浆维生素 B9 (VB9) 和维生素 B12 (VB12) 水平对 p53 表达的影响。方法 选择自 2015 年 3 月~2018 年 5 月 68 例 MBA 患者为病例组, 另选取同期 68 例健康者为对照组。分别比较 VB9 和 VB12 的分布情况、比较 p53 在不同程度 VB9 和 VB12 分布中的表达水平、比较两组间同型半胱氨酸 (Hcy) 的含量和分布情况和分析低 VB9 和 VB12 的 MBA 患者同型半胱氨酸的含量与 p53 表达的相关性。结果 病例组 VB9 和 VB12 水平分别为 $5.28 \pm 0.36 \text{ ng/ml}$ 及 $144.51 \pm 28.17 \text{ pg/ml}$, 显著低于对照组 ($5.73 \pm 0.45 \text{ ng/ml}$, $176.33 \pm 31.54 \text{ pg/ml}$), 差异有统计学意义 ($t=-6.44$, -6.20 , 均 $P<0.001$)。在 VB9 和 VB12 含量均偏低时, 病例组患者的分布频数显著高于对照组 ($t=4.847$, $P<0.05$)。在 VB9 和 VB12 含量均偏低时, 病例组细胞 p53 表达中度和重度染色的比例较高, 与其余两组病例组的差异具有统计学意义 ($t=7.551$, $P<0.05$)。病例组的同型半胱氨酸含量为 $43.2 \mu\text{mol/L}$, 且同型半胱氨酸患者分布比例为 80%, 显著高于对照组 ($t=4.226$, $P<0.05$)。在 VB9 和 VB12 含量均偏低时患者中同型半胱氨酸含量与 p53 表达呈正相关性 ($Y=0.655X+12.42$, $r=0.661$)。结论 p53 的高表达可作为低 VB9 和 VB12 水平诱导 MBA 产生的标志物, 为 MBA 的诊断提供有效参考。

关键词: 巨幼红细胞性贫血; 维生素 B9; 维生素 B12; 同型半胱氨酸; p53

中图分类号: R556.2; R446.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 02-012-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.02.004

Effects of Plasma Vitamin B9 and Vitamin B12 Levels on p53 Expression in Bone Marrow Tissues in Patients with Megaloblastic Anemia

ZHANG Rong¹, LI Guo-hui², WANG Ying¹, LIU Zan¹, ZHAO Hui-ying¹, LIANG Ying-min¹

(1. Department of Blood, Xi'an High Tech Hospital, Xi'an 710065, China; 2. Department of Blood, Tangdu Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of plasma vitamin B9 (VB9) and vitamin B12 (VB12) levels on p53 expression in patients with megaloblastic anemia (MBA). **Methods** From March 2015 to May 2018, 68 MBA patients in Xi'an High Tech Hospital were selected as the case group, and 68 healthy patients in the same period were selected as the control group. The distribution of VB9 and VB12 was compared, the expression level of p53 in the distribution of VB9 and VB12 was compared, the content and distribution of homocysteine (Hcy) between the two groups were compared, and the correlation between the content of Hcy and the expression of p53 in MBA patients with low VB9 and VB12 was analyzed. **Results** The average levels of VB9 and VB12 in the case group were $5.28 \pm 0.36 \text{ ng/ml}$ and $144.51 \pm 28.17 \text{ pg/ml}$, respectively, and significantly lower than that in the control group ($5.73 \pm 0.45 \text{ ng/ml}$, $176.33 \pm 31.54 \text{ pg/ml}$), the difference was statistically significant ($t=-6.44$, -6.20 , all $P<0.001$). When the contents of VB9 and VB12 were both low, the distribution frequency of patients in the case group was significantly higher than that in the control group ($t=4.847$, $P<0.05$). When the content of VB9 and VB12 were both low, the proportion of moderate and severe staining of p53 expression was the highest in the case group and the difference between the other two groups was statistically significant ($t=7.551$, $P<0.05$). The content of Hcy in the case group was 43.2 mol/L and the distribution proportion of Hcy was 80%, which was significantly higher than that in the control group ($t=4.226$, $P<0.05$). There was a positive linear association between Hcy content and p53 expression in patients with low levels of both VB9 and VB12 ($Y=0.655X+12.42$, $r=0.661$). **Conclusion** The high expression of p53 may serve as a marker for the induction of MBA with low VB9 and VB12 levels, providing an effective reference for the diagnosis of MBA.

基金项目: 陕西省卫生计生科研基金项目 (2016D062)。

作者简介: 张蓉 (1968-), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 白血病、淋巴瘤, E-mail: xizhangr@163.com。

通讯作者: 梁英民 (1957-), 男, 硕士, 主任医师, 研究方向: 白血病、淋巴瘤, E-mail: liangym@fmmu.edu.cn。

Keywords: megaloblastic anemia; vitamin B9; vitamin B12; homocysteine; p53

巨幼红细胞性贫血 (megaloblastic anemia, MBA) 又称巨细胞性贫血, 其特征是红细胞数量减少, 以及存在体积异常和发育不良的红细胞 (巨母细胞)。由于该类红细胞体积较大, 无法进入血液循环^[1]。MBA 主要与叶酸 (VB9) 或维生素 B12 (VB12) 的缺乏相关, 具体而言, 由于抑制前红细胞 DNA 的合成和诱导细胞凋亡, 从而阻碍向网织红细胞的转化, 最终导致全血细胞的减少^[2-3]。然而诱导细胞凋亡的关键因子之一是 p53, 其可以通过保护 DNA 和核苷酸以发挥维持遗传物质的完整性的作用^[4]。因此, 本研究旨在探究 MBA 患者血浆中 VB9 和 VB12 水平对 p53 表达的影响。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选择 2015 年 3 月~2018 年 5 月西安高新医院 68 例 MBA 患者为病例组, 另选取同期 68 例健康者为对照组。两组的一般资料差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。所有研究对象均自愿参加且签署知情同意书, 本研究经由我院医学伦理委员会批准。

纳入标准: 参照 WHO 中关于巨幼红细胞性贫血的诊断标准^[5], 确诊为 MBA 者。

排除标准: 精神疾病者、全身免疫性疾病者、并发恶性肿瘤者。

1.2 仪器与试剂 采用同型半胱氨酸测定试剂盒 (bsk00589, 博奥森), VB9 测定试剂盒 (JL47806, 江莱生物), VB12 测定试剂盒 (JL11843, 江莱生物) 分别对血浆中同型半胱氨酸浓度 (2.5~80 $\mu\text{mol/L}$), VB9 (5.00~5.90 ng/ml) 和 VB12 (124.00~201.00 pg/ml) 进行测定。采用免疫组化法分析骨髓标本石蜡包埋块 p53 的表达情况, 具体操作步骤严格按照说明书进行^[6]。

1.3 方法 探究两组 VB9 和 VB12 的分布情况。

比较 p53 在不同程度 VB9 和 VB12 分布中的表达水平。免疫组化结果按照染色强度进行判断, 轻度染色表示着色细胞阳性率 $< 10\%$; 中度染色表示着色细胞阳性率 $10\% \sim 50\%$; 重度染色表示着色细胞阳性率 $> 50\%$ 。未染色和轻度染色视为结果阴性, 中度和重度染色视为结果阳性。

比较两组间同型半胱氨酸的含量和分布情况。

低 VB9 和 VB12 的 MBA 患者同型半胱氨酸的含量与 p53 表达的相关性。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计学分析软件进行数据处理, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计数资料以 $n(\%)$ 表示。两组间比较采用 Student's t 检验。采用线性回归分析两连续变量之间的线性关联性。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

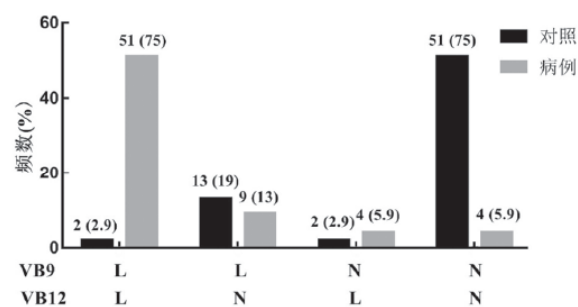
2 结果

2.1 两组患者一般情况及 VB9, VB12 及 p53 水平比较 见表 1。对照组 VB9, VB12 及 p53 水平均高于病例组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 病例组及对照组 VB9, VB12 及 p53 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	病例组	对照组	t	P
VB9 (ng/ml)	5.28 ± 0.36	5.73 ± 0.45	-6.44	<0.000 1
VB12 (pg/ml)	144.51 ± 28.17	176.33 ± 31.54	-6.20	<0.000 1
p53 (%)	43.21 ± 4.47	13.16 ± 2.39	48.89	<0.000 1

2.2 两组患者 VB9 和 VB12 分布情况比较 见图 1。在 VB9 和 VB12 含量均偏低时, 病例组患者的分布频数显著高于对照组 ($t=4.847$, $P < 0.05$)。在 VB9 和 VB12 含量均正常时, 对照组的分布频数明显高于病例组 ($P < 0.05$)。两组间低 VB9 和正常 VB12, 正常 VB9 和低 VB12 的分布频数比例相当, 差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: L 为偏低, N 为正常

图 1 两组 VB9 和 VB12 分布情况比较

2.3 p53 在不同程度 VB9 和 VB12 分布中的表达水平比较 见图 2。在 VB9 含量偏低且 VB12 含量正常时, 对照组中细胞 p53 表达未染色和轻度染色的比例显著高于中、重度染色的比例 ($P < 0.05$)。在 VB9 和 VB12 含量均偏低时, 病例组细胞 p53 表达中、重度染色的比例显著高于未染色和轻度染色的比例, 并且与其余两组病例组的差异具有统计学意义 ($t=7.551$, $P < 0.05$)。

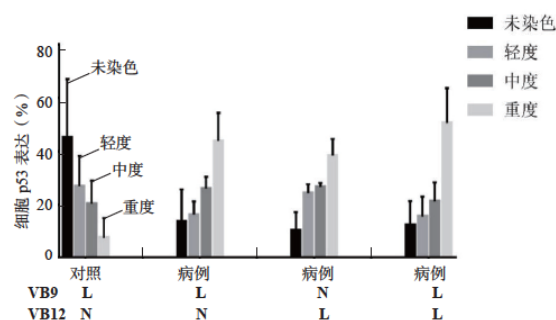


图 2 p53 在不同程度 VB9 和 VB12 分布中的表达水平比较

2.4 两组患者同型半胱氨酸的含量和分布情况 见图3。病例组的同型半胱氨酸含量为 $43.21\mu\text{mol/L}$ ，且同型半胱氨酸患者分布比例为 80%，对照组的同型半胱氨酸含量为 $13.16\mu\text{mol/L}$ ，且同型半胱氨酸分布比例为 20%，两组间的差异具有统计学意义 ($t=4.226$, $P < 0.05$)。

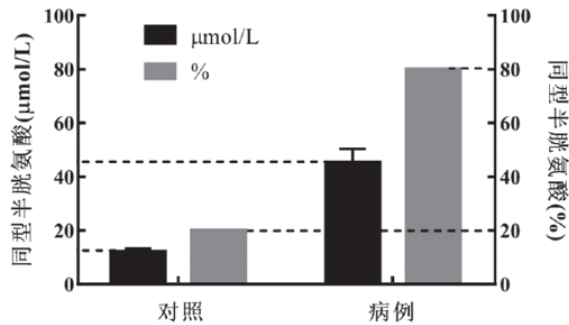


图3 比较两组间同型半胱氨酸的含量和分布情况

2.5 低 VB9 和 VB12 的 MBA 患者同型半胱氨酸含量与 p53 表达的相关性 见图4。由 2.2 结果可知，在 VB9 和 VB12 含量均偏低时病例组患者的分布频数可达 75%，因此接下来探究在这种类型患者中同型半胱氨酸含量与 p53 表达比例的相关性，结果显示两者之间呈现正相关性 ($Y=0.655X+12.42$, $r=0.661$)。

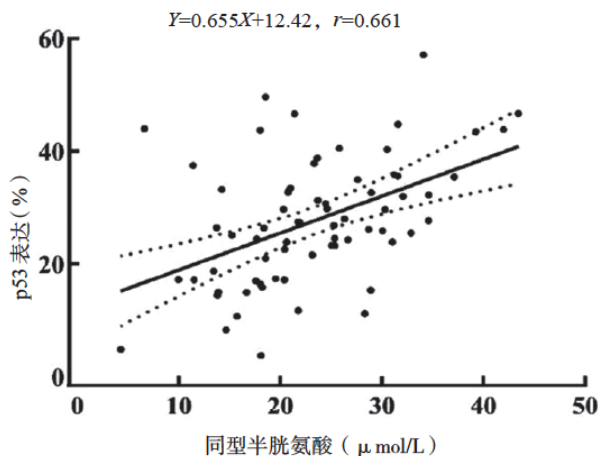


图4 低 VB9 和 VB12 的 MBA 患者同型半胱氨酸的含量与 p53 表达的相关性

3 讨论

MBA 的特征是红细胞数量减少，以及存在体积异常和发育不良的红细胞 (巨母细胞)，其主要是由 VB9 和 VB12 的缺乏所致^[7]。同型半胱氨酸水平是血浆中低 VB9 和 VB12 的指示剂^[8]。

本研究探究两组 VB9 和 VB12 的分布情况，结果显示在 VB9 和 VB12 含量均偏低时，病例组患者的分布频数显著高于对照组 ($P < 0.05$)。在 VB9 和 VB12 含量均正常时，对照组的分布频数明显高于病例组 ($P < 0.05$)，这可再次验证上述说法。

本研究比较 p53 在不同程度 VB9 和 VB12 分布中的表达水平，结果显示在 VB9 和 VB12 含量均偏低时，病例组细胞 p53 表达中、重度染色的比例显著高于未染色和轻度染色的比例，并且与其余两组病例组的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，可能存在的作用机制是：p53 作为修复受损 DNA 第一线，它是细胞核 DNA 的主要保护因子，保护细胞 DNA 免受各种损伤，它通过触发细胞凋亡来消除受损的细胞^[9-11]。因而可在 MBA 细胞中发现 p53 的高表达，这可能是对低水平 VB9 和 VB12 引起的细胞损伤的一种反馈性应答机制^[12-15]。

本研究比较两组间同型半胱氨酸的含量和分布情况，结果显示病例组的同型半胱氨酸含量为 $43.2\mu\text{mol/L}$ 且同型半胱氨酸患者分布比例为 80%，对照组的同型半胱氨酸含量为 $13.1\mu\text{mol/L}$ 时同型半胱氨酸分布比例为 20%，两组间的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

最后，本研究探究低 VB9 和 VB12 的 MBA 患者同型半胱氨酸的含量与 p53 表达的相关性，结果表明在 MBA 患者中两者呈正相关 ($Y=0.655X+12.42$, $r=0.661$)。

综上所述，本研究发现在 MBA 病例中 VB9 和 VB12 低水平，并伴随同型半胱氨酸和 p53 的高表达。因此，测定贫血患者中 p53 的表达可能有助于 MBA 的诊断。但是由于本研究中样本量较小，实验结果可能存在偏颇，后续研究仍将继续围绕此类课题更深入、全面的开展。

参考文献：

- [1] GREEN R, DATTA MITRA A. Megaloblastic anemias: nutritional and other causes[J]. Med Clin North Am, 2017, 101(2):297-317.
- [2] LANGAN R C, GOODBRED A J. Vitamin B12 deficiency: recognition and management[J]. Am Fam Physician. 2017, 96(6):384-389.
- [3] EBIHARA Y, MA Feng, TSUJI K. Generation of red blood cells from human embryonic/induced pluripotent stem cells for blood transfusion [J]. International Journal of Hematology, 2012, 95 (6),610-616.
- [4] PELLER S, FRENKEL J, LAPIDOT T, et al. The onset of p53-dependent apoptosis plays a role in terminal differentiation of human normoblasts [J]. Oncogene, 2003, 22(30):4648-4655.
- [5] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 北京: 科学出版社, 2007:12-14.
ZHANG Zhinan, SHEN Ti. Criteria for diagnosis and efficacy of hematological diseases[M]. Beijing: Science Press, 2007:12-14.
- [6] KOURY M J, PRICE J O, HICKS G G. Apoptosis in megaloblastic anemia occurs during DNA synthesis by a p53-independent, nucleoside-reversible mechanism[J]. Blood, 2000, 96(9):3249-3255. (下转 21 页)