

## 急性白血病患者骨髓细胞 LIMD1, VEGF-C, CTGF 和 Survivin 的 mRNA 异常表达及相关性研究\*

杨晓玲<sup>1</sup>, 何大保<sup>2</sup>, 李文郎<sup>2</sup> (1. 深圳市宝安区松岗人民医院检验科, 广东深圳 518105;  
2. 深圳市龙华新区中心医院检验科, 广东深圳 518110)

**摘要:**目的 研究 LIM 结构域蛋白 1 抗体在急性白血病患者中的异常表达及其相关性。方法 选择首次确诊且未接受过治疗的急性白血病患者纳入初治组、接受化疗并达到完全缓解的白血病患者纳入缓解组、骨髓象正常的非恶性血液疾病患者纳入对照组, 分离培养骨髓细胞, 检测细胞中 LIMD1, VEGF-C, CTGF 和 Survivin 的 mRNA 含量及细胞增殖能力。结果 LIMD1 的 mRNA 含量在三组中从小到大顺序为初治组( $14.52 \pm 1.96$ )mg, 缓解组( $76.67 \pm 9.56$ )mg 和对照组( $111.27 \pm 16.45$ )mg, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); MTT 值在三组中从小到大顺序为对照组( $100 \pm 15.34$ ), 缓解组( $151.77 \pm 19.34$ )和初治组( $314.45 \pm 52.28$ ), 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); VEGF-C 的 mRNA 含量在三组中从小到大顺序为对照组( $104.78 \pm 15.14$ )mg, 缓解组( $146.63 \pm 18.84$ )mg 和初治组( $259.34 \pm 31.45$ )mg, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); CTGF 的 mRNA 含量在三组中从小到大顺序为对照组( $99.27 \pm 16.67$ )mg, 缓解组( $162.15 \pm 19.34$ )mg 和初治组( $325.56 \pm 36.72$ )mg, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); Survivin 的 mRNA 含量在三组中从小到大顺序为对照组( $109.44 \pm 15.78$ )mg, 缓解组( $134.39 \pm 16.67$ )mg 和初治组( $277.74 \pm 29.34$ )mg, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); LIMD1 与增殖能力以及 VEGF-C, CTGF, Survivin 的 mRNA 含量呈负相关( $\beta = 0.679 \sim 0.795$ ,  $P < 0.05$ )。结论 LIMD1 在急性白血病患者骨髓细胞中的表达减少, 且与细胞增殖以及恶性生物学分子 VEGF-C, CTGF 和 Survivin 的表达具有相关性。

**关键词:**急性白血病; LIM 结构域蛋白 1; 骨髓细胞; 原癌基因

中图分类号: R557; Q786 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)06-072-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.06.020

### Relationship Study on Abnormal Expression of the mRNA of LIMD1, VEGF-C, CTGF and Survivin in Patients with Acute Leukemia

YANG Xiao-ling<sup>1</sup>, HE Da-bao<sup>2</sup>, LI Wen-lang<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the Songgang People's Hospital of Baoan District, Guangdong Shenzhen 518105, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Central Hospital of Longhua New District, Guangdong Shenzhen 518110, China)

**Abstract:** **Objective** To study the abnormal expression of LIM domain-containing protein 1 antibody in acute leukemia patients and its relationship. **Methods** First diagnosed with acute leukemia patients who did not receive treatment were enrolled in initial treatment group, leukemia patients received chemotherapy and achieve complete remission were enrolled in remission group, non-malignant blood diseases patients with bone marrow normal were enrolled in control group. Then bone marrow cells were isolated and cultured, LIMD1, VEGF-C, CTGF and Survivin mRNA contents and cell proliferation were detected. **Results** From the lowest to the highest, the LIMD1 mRNA levels in three groups were initial treatment group ( $14.52 \pm 1.96$ )mg, remission group ( $76.67 \pm 9.56$ )mg and control group ( $111.27 \pm 16.45$ )mg. From the lowest to the highest, the MTT levels in three groups were control group ( $100 \pm 15.34$ ), remission group ( $151.77 \pm 19.34$ ) and initial treatment group ( $314.45 \pm 52.28$ ). From the lowest to the highest, the VEGF-C mRNA levels in three groups were control group ( $104.78 \pm 15.14$ )mg, remission group ( $146.63 \pm 18.84$ )mg and initial treatment group ( $259.34 \pm 31.45$ )mg. From the lowest to the highest, the CTGF mRNA levels in three groups were control group ( $99.27 \pm 16.67$ )mg, remission group ( $162.15 \pm 19.34$ )mg and initial treatment group ( $325.56 \pm 36.72$ )mg. From the lowest to the highest, the Survivin mRNA levels in three groups were control group ( $109.44 \pm 15.78$ )mg, remission group ( $134.39 \pm 16.67$ )mg, and initial treatment group ( $277.74 \pm 29.34$ )mg, LIMD1 was negatively correlated with proliferation and mRNA contents of VEGF-C, CTGF, Survivin ( $\beta = 0.679 \sim 0.795$ ,  $P$  all  $< 0.05$ ). **Conclusion** The expression LIMD1 in patients with acute leukemia cells decreases and correlates with cell proliferation and the expression of malignant molecular VEGF-C, CTGF, Survivin.

**Keywords:** acute leukemia; LIM domain-containing protein 1; bone marrow cells; proto-oncogene

急性白血病是血液系统高度异质性的一类恶性肿瘤, 发病率呈逐年升高的趋势。目前, 关于急性白血病的发病机制仍未完全阐明, 一部分患者急

性白血病的发生与遗传因素有关<sup>[1]</sup>。在白血病的发生过程中, 多种基因表达异常, 进而会导致造血干细胞异常增殖、无限扩增。LIM 结构域蛋白 1

\* 作者简介: 杨晓玲(1985-), 女, 本科, 学士, 主管检验师, 研究方向: 骨髓细胞诊断学, E-mail: hedabao1223@126.com。

(LIM domain-containing protein 1, LIMD1)是新发现的一类抑癌基因,由其编码的蛋白具有促凋亡和抗增殖作用<sup>[2,3]</sup>。有关这方面的研究国内外文献报道较少。为此,本文拟初步研究 LIM 结构域蛋白 1 抗体在急性白血病患者中的异常表达及其与细胞恶性生物学行为的相关性。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选择 2012 年 5 月~2014 年 6 月期间在深圳市宝安区松岗人民医院血液科确诊为急性白血病的 34 例患者纳入初治组,所有患者均为初次诊断、未接受过治疗,其中男性 19 例,女性 15 例,年龄(44.28±6.23)岁;将同期在我院接受化疗并达到完全缓解的 25 例患者纳入缓解组,其中男性 14 例,女性 11 例,年龄(45.64±5.96)岁;将同期在我院接受骨髓穿刺且骨髓象正常的 22 例非恶性血液疾病患者纳入对照组,其中男性 12 例,女性 10 例,年龄 44.19±6.18 岁。纳入及诊断标准:急性白血病及经化疗达到完全缓解的诊断标准参考张之南主编的《血液病诊断及疗效标准》第三版。本次研究报请医院伦理委员会批准,告知患者研究事项,且所有患者均签署知情同意书。三组患者性别、年龄等资料方面比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

1.2 试剂和仪器 TRIzol 及逆转录试剂盒:美国 Invitrogen 公司;DNA marker DL2000, RNA, RT-PCR 等试剂盒:日本 TakaRa 公司;PCR 仪:美国 ABI 公司 2720 Thermal Cycler 型;荧光实时定量 PCR 仪:澳大利亚 Corbett 公司 RotorGene 6000 型。所用引物均由上海生物工程股份有限公司合成。

## 1.3 方法

1.3.1 骨髓细胞分离方法:取三组患者的骨髓标本,采用 Ficoll 密度梯度离心的方法分离骨髓单个核细胞,调节密度后常规培养。

1.3.2 基因 mRNA 含量检测方法:取培养的骨髓细胞,加入 Trizol 裂解液后抽提细胞中的 RNA,反转录为 cDNA 后取产物进行 PCR 扩增,扩增基因包括。LIM 结构域蛋白 1(LIM domain-containing protein 1, LIMD1)、血管内皮生长因子-C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、抗凋亡基因 Survivin,以  $\beta$ -actin 作为内参计算目的基因的 mRNA 含量。

1.3.3 细胞增殖能力检测方法:取培养的骨髓细胞,采用 MTT 试剂盒检测细胞增殖能力,在酶标仪上读取 490 nm 处的吸光值,计算增殖能力。

1.4 统计学分析 采用 SPSS20.0 软件录入数据,计量资料用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,三组间计量资料的比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 法。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 骨髓细胞基因 mRNA 含量及增殖情况对比见表 1。骨髓细胞中 LIMD1 的 mRNA 含量由低到高为初治组、缓解组 and 对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ); VEGF-C, CTGF, Survivin 的 mRNA 含量顺序由低到高排列为对照组、缓解组和初治组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );骨髓细胞的 MTT 值由低到高分别为对照组、缓解组和初治组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表 1 三组骨髓细胞基因 mRNA 含量及增殖情况对比( $\bar{x}\pm s$ )

组别	对照组( $n=22$ )	初治组( $n=34$ )	缓解组( $n=25$ )	F	P
LIMD1(mg)	111.27±16.45	14.52±1.96 <sup>a</sup>	76.67±9.56 <sup>ab</sup>	16.542	<0.05
VEGF-C(mg)	104.78±15.14	259.34±31.45 <sup>a</sup>	146.63±18.84 <sup>ab</sup>	7.836	<0.05
CTGF(mg)	99.27±16.67	325.56±36.72 <sup>a</sup>	162.15±19.34 <sup>ab</sup>	12.135	<0.05
Survivin(mg)	109.44±15.78	277.74±29.34 <sup>a</sup>	134.39±16.67 <sup>ab</sup>	9.783	<0.05
MTT 值	100±15.34	314.45±52.28 <sup>a</sup>	151.77±19.34 <sup>ab</sup>	8.647	<0.05

注:与对照组比较,<sup>a</sup>  $P<0.05$ ;与初治组比较,<sup>b</sup>  $P<0.05$ 。

2.2 LIMD1 与恶性生物学行为的相关性 Spearman 秩相关分析显示,LIMD1 的 mRNA 含量与细胞增殖能力以及 VEGFC, CTGF, Survivin 的 mRNA 含量呈负相关,相关系数分别为 0.679, 0.772, 0.795, 0.724。

3 讨论 急性白血病的发生与遗传因素密切相关,多种基因表达异常参与疾病的发生过程<sup>[4,5]</sup>。在造血干细胞正常的分化、成熟和增殖过程中,多种抑癌基因如 p53, RB, LIMD1, INK-ARF 和

PML 参与细胞周期以及增殖过程的调节,能够通过诱导细胞凋亡的方式来清除异常增殖的造血干细胞<sup>[6]</sup>。当一种或几种抑癌基因发生丢失、突变时,会造成造血干细胞发生异常增殖和无限扩增,最终导致白血病的发生<sup>[7]</sup>。在多种已知与白血病发生有关的抑癌基因中,LIMD1 是定位于人类 3 号染色体常见缺失区域 1(C3CER1)基因簇的抑癌基因,参与细胞增殖、分化等过程的调节,具有抑制恶性肿瘤细胞增殖、迁移的功能<sup>[8]</sup>。LIMD1 基因

编码的基因含有独特的 LIMD1 结构域,具体是指由 CX<sub>2</sub>CX<sub>16-23</sub>HX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>16-21</sub>CX<sub>25</sub> 5 个氨基酸残基构成的序列(C:半胱氨酸、H:组氨酸、D:天冬氨酸、X:任意氨基酸)。已有多种研究证实,在多种实体恶性肿瘤中,LIMD1 的表达量显著减少,且与肿瘤恶性程度具有良好的相关性<sup>[9]</sup>。而在诸多与恶性生物学相关的基因中,Survivin 是一类抗凋亡基因,能够抑制凋亡分子 Caspase-3/7,进而阻断异常增殖的造血干细胞进入凋亡程序,造成细胞恶性增殖<sup>[10]</sup>;VEGFC 以及 CTGF 与血管新生过程有关,能够增加白血病骨髓中新生血管的形成,进而促进瘤的发展<sup>[11,12]</sup>。为了进一步明确 LIMD1 表达减少与白血病发生的关系,我们检测了白血病患者骨髓细胞的恶性生物学行为并分析 LIMD1 与恶性生物学行为的相关性。

从本次研究的结果来看,初治组骨髓细胞中 LIMD1 的 mRNA 含量最低,对照组最高,三组之间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),与国内廖子龙等<sup>[10]</sup>的研究结论相一致;VEGFC,CTGF,Survivin 的 mRNA 含量在三组中由低到高的顺序为对照组、缓解组和初治组,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。可得出结论:LIMD1 与增殖能力以及 VEGFC,CTGF,Survivin 的 mRNA 含量呈负相关。

综上所述,LIMD1 在急性白血病患者骨髓细胞中的表达减少,且与细胞增殖以及恶性生物学分子 VEGFC,CTGF,Survivin 的表达具有相关性。因受到样本对象来源与数量的限制,且可供参考文献资料较少,所得结论还有待于更进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] Lee JW, Kim HS, Hwang J, et al. Regulation of HOXA9 activity by predominant expression of DACH1 against C/EBP  $\alpha$  and GATA-1 in myeloid leukemia with MLL-AF9[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012,426(3):299-305.
- [2] Oram SH, Thoms JA, Pridans C, et al. A previously unrecognized promoter of LMO2 forms part of a transcriptional regulatory circuit mediating LMO2 expression in a subset of T-acute lymphoblastic leukaemia patients[J]. Oncogene, 2010,29(43):5796-5808.
- [3] 付伟,秦鸿雁,严学倩,等. LIM 结构域蛋白 FHL1C 抑制 Notch 信号途径的转录激活研究[J]. 现代生物医学进展, 2011,11(4):657-661.
- [4] 俞昱,陈静桂. 急性髓系白血病患者 TLT3-ITD 和 NPM1 基因突变表达及在判断预后中的意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2015,14(7):565-568.
- [5] Yu G, Chen JG. Expression of TLT3-ITD and NPM1 gene mutations in patients with acute myeloid leukemia and its significance in the prognosis of patients with acute myeloid leukemia[J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2015,14(7):565-568.
- [6] Kapoor S. Letter to the editor on "regulation of HOXA9 activity by predominant expression of DACH1 against C/EBP  $\alpha$  and GATA-1 in myeloid leukemia with MLL-AF9"[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012,426(4):664.
- [7] Weeks RJ, Kees UR, Song S, et al. Silencing of TE-STIN by dense biallelic promoter methylation is the most common molecular event in childhood acute lymphoblastic leukaemia[J]. Mol Cancer, 2010(9):163-163.
- [8] 王立敏,李桂玲. LIM 同源结构域转录因子 LHX-3 与 LHX-4 的研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2013,40(5):518-521.
- [9] Wang LM, Li GL. Advances of the LHX-3 and LHX4 LIM-homeodomain transcription factors[J]. International Journal of Pediatrics, 2013,40(5):518-521.
- [10] 韩莹. 急性白血病患者血清 VEGF, IL-8 和 TF 检测的临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2012,27(4):132-133.
- [11] Han Y. Clinical significance of detection of serum VEGF, IL-8 and TF in patients with acute leukemia[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012,27(4):132-133.
- [12] 陈章兴,戴益琛,谈秋慧. 27 例大肠癌组织中 LIMD1 表达特点[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2014,23(1):45-46.
- [13] Chen ZX, Dai YC, Tan QH. Expression of LIMD1 in 27 cases of colorectal cancer[J]. China Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2014,23(1):45-46.
- [14] 廖子龙,刘琳,王钥,等. LIMD1 基因在成人急性白血病患者中的异常表达及临床意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2015,23(1):34-38.
- [15] Liao ZL, Liu L, Wang Y, et al. Expression and clinical significance of LIMD-1 gene in adult patients with acute leukemia[J]. Journal of Experimental Hematology, 2015,23(1):34-38.
- [16] 周琛,环亚红. 老年白血病人 Survivin 基因 mRNA 表达及其与预后的关系研究[J]. 现代医学, 2015,43(2):190-193.
- [17] Zhou C, Huan YH. MRNA expression of Survivin gene and its relationship with prognosis in elderly patients with leukemia[J]. Modern Medicine Journal, 2015,43(2):190-193.
- [18] 刘学文,白学琴,韩轩茂,等. 急性白血病治疗前后骨髓中 VEGF, CTGF mRNA 水平的研究[J]. 肿瘤防治研究, 2015,42(4):359-362.
- [19] Liu XW, Bai XQ, Han XM, et al. VEGF and CTGF mRNA levels in marrow before and after therapy for acute leukemia[J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2015,42(4):359-362.

收稿日期:2015-06-15

修回日期:2015-10-15