

## 骨髓中 CDKN1C 的表达在骨髓增生异常综合征和继发性急性髓系白血病患者中检测的临床意义\*

付晓英<sup>1</sup>, 李光<sup>2</sup>, 靳延利<sup>3</sup> (1. 宝鸡市中心医院血液科, 陕西宝鸡 721008; 2. 西安市中心医院西安市血液病研究所, 西安 710003; 3. 延安市人民医院骨科一病区, 陕西延安 716000)

**摘要:**目的 探讨骨髓中蛋白细胞周期激酶抑制剂 1C(CDKN1C)的表达在骨髓增生异常综合征(MDS)和继发性急性髓系白血病(AML)患者中检测的临床意义。方法 选取 125 例 MDS/AML 患者作为研究对象,同时选取 20 例健康人群作为健康对照组,分析 MDS/AML 患者骨髓 CD34+ 细胞中 CDKN1C mRNA 和蛋白表达水平,比较不同 CDKN1C 的表达水平 MDS 患者生存率,采用 Cox 回归分析 MDS 和 AML 患者生存率影响因素,并分析治疗方法对不同 CDKN1C 的表达水平 MDS 患者生存率的影响。结果 MDS/AML 患者骨髓 CD34+ 细胞中 CDKN1C mRNA 和蛋白表达水平显著高于健康对照组( $t=5.324, 7.326, P=0.002, 0.000$ ),且与 BM 计数呈正相关( $r=2.014, P=0.004$ );CDKN1C 高表达水平组患者的生存率显著低于 CDKN1C 低表达水平组和 CDKN1C 中表达水平组( $P<0.05$ );Cox 回归分析结果显示高龄、高 BM 计数、细胞遗传学风险差以及 CDKN1C 阳性显著影响 MDS/AML 患者生存率(95%CI=1.10~1.32, 1.92~4.40, 1.18~2.67, 1.03~2.32,  $P=0.034\sim 0.000$ );MDS/AML 化疗的 CDKN1C 阳性表达组患者生存率显著低于 CDKN1C 阴性表达组患者( $t=5.314, P=0.002$ )。结论 MDS/AML 患者骨髓中 CDKN1C 的表达显著增高,CDKN1C 高表达显著影响化疗 MDS/AML 患者的生存率。

**关键词:**蛋白细胞周期激酶抑制剂 1C(CDKN1C);骨髓增生异常综合征;继发性急性髓系白血病;骨髓中图分类号:R551;R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)05-036-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.05.010

### Clinical Significance of Expression of CDKN1C in Bone Marrow in Patients with Myelodysplastic Syndrome and Secondary Acute Myeloid Leukemia

FU Xiao-ying<sup>1</sup>, LI Guang<sup>2</sup>, JIN Yan-li<sup>3</sup>

(1. Department of Hematology, Baoji Central Hospital, Shaanxi Baoji 721008, China;

2. Xi'an Central Hospital, Xi'an Institute of Hematology, Xi'an 710003, China;

3. Department of Orthopedics Ward, Yan'an People's Hospital, Shaanxi Yan'an 716000 China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of CDKN1C in bone marrow in myelodysplastic syndromes and clinical significance of the detection of syndrome and secondary acute myeloid leukemia patients. **Methods** 125 patients with MDS/AML were selected as the research object, and selected 20 cases of healthy people as healthy control group, and to investigate the mRNA and protein expression in CD34+ cells in bone marrow the expression of MDS/AML in patients and the survival rate of different expression of CDKN1C, to analyze the factors for survival rate of patients with MDS by Cox regression, and analyze the different treatment methods in patients with MDS/AML. **Results** The expression levels of CDKN1C mRNA and protein of bone marrow CD34+ cells in the patients with MDS/AML were significantly higher than the healthy control group ( $t=5.324, 7.326; P=0.002, 0.000$ ), and which was positive with BM count ( $r=2.014, P=0.004$ ); the survival rate of CDKN1C high expression levels in patients with MDS/AML was significantly lower than that of the low expression of CDKN1C group and intermediate CDKN1C expression group ( $P<0.05$ ). Cox regression analysis showed that age, high BM count, cytogenetic risk difference and CDKN1C positive significantly affect the survival rate of patients with MDS/AML (95%CI=1.10~1.32, 1.92~4.40, 1.18~2.67, 1.03~2.32,  $P=0.034\sim 0.000$ ). MDS/AML chemotherapy in CDKN1C positive group was significantly lower than the survival rate of patients with CDKN1C negative expression group ( $t=5.314, P=0.002$ ). **Conclusion** The expression of CDKN1C in bone marrow of patients with MDS/AML was significantly increased, and the high expression of CDKN1C MDS/AML effect of chemotherapy on the survival rate of patients with MDS/AML.

**Keywords:** CDKN1C; myelodysplastic syndrome; secondary acute myeloid leukemia; bone marrow

骨髓增生异常综合征(MDS)属于起源于造血 点是髓系细胞分化及发育异常,临床表现为无效造血、难治性血细胞减少、造血功能衰竭,且具有向急干细胞的一组异质性髓系克隆性疾病。其主要特

\* 基金项目:陕西省自然科学基金项目(2013JM4016)。

作者简介:付晓英(1979-),女,本科,主管检验师,研究方向:骨髓检验, E-mail: fuxiaoying1979@163.com。

通讯作者:靳延利, E-mail: 1409330421@qq.com。

性髓系白血病(AML)转化的高风险<sup>[1,2]</sup>。临床治疗方法主要包括化疗、药物治疗或造血干细胞移植治疗等<sup>[3]</sup>。临床观察发现化疗的效率很低,其原因尚不清楚,其可能机制是静止的白血病干细胞(LSC)抵抗细胞周期变动的细胞毒性治疗。然而,化疗造成细胞静止并可能促进或促进耐药性的机制尚不清楚。蛋白细胞周期激酶抑制剂 1C (CDKN1C)是由 *cdkn1c* 印记基因编码的蛋白,有研究表明 MDS 患者的 CDKN1C 表达异常<sup>[4,5]</sup>,为了探讨骨髓中 CDKN1C 的表达在 MDS 和继发性急性髓系白血病(AML)患者中检测的临床意义,对 125 例 MDS/AML 患者进行研究,现将相关内容报道如下。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选取 125 例 MDS/AML 患者作为研究对象,所有患者经诊断符合 WHO 有关 MDS/AML 的诊断标准<sup>[6]</sup>,20 例健康对照组为同期体检的健康人群。本研究经医院伦理委员会讨论后通过,所有患者及其家属知情后签署知情同意书,排除丢失随访的患者。

1.2 研究方法 免疫组织化学分析:在患者入院后收集患者的相关临床资料,并立即给予活组织检查,并送病理检查。标本进行 10 ml/dl 福尔马林固定,石蜡包埋后进行脱蜡水化、抗原修复、PBS 洗涤、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育、封闭、一抗孵育、二抗室温孵育、ABC 室温孵育、DAB 染色、苏木素复染后用双蒸水洗涤,脱水封胶盖片保存。两名有经验的病理学专家进行读片,确定 CDKN1C 表达。根据 MDS/AML 患者 CDKN1C 的表达水平分成 CDKN1C 阳性表达组和 CDKN1C 阴性表达组,比较两组患者的相关临床资料。

RT-PCR 分析:合成相关引物,CDKN1C 基因和内参基因  $\beta$ -actin 的引物序列均由上海生工公司

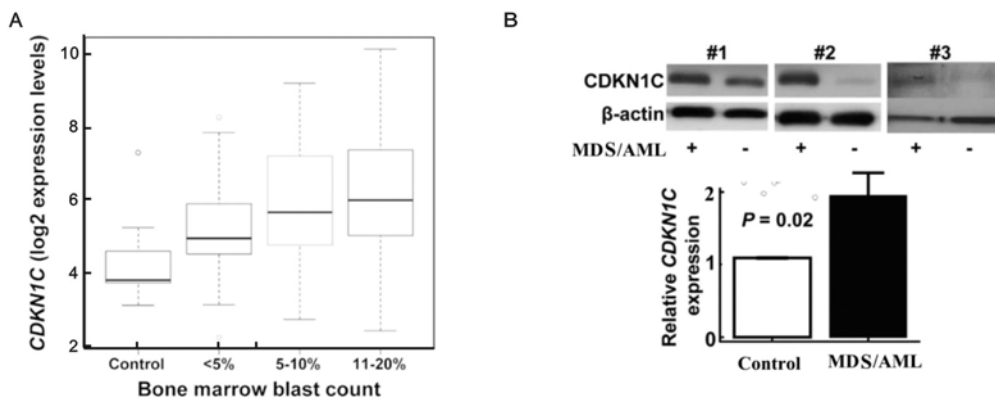
设计并合成,提取总 RNA,并确定总 RNA 纯度,样品 cDNA 合成,凝胶电泳后,图像分析系统摄片并测定分析其光密度,计算各个样本 CDKN1C 基因 mRNA 表达水平,表达量的相对值(relative expression value)=待测基因扩增条带的灰度值/ $\beta$ -actin 基因扩增条带的 A 值。根据 125 例 MDS/AML 患者 CDKN1C 的表达水平从低到高排列,分成 CDKN1C 低表达水平组( $\leq 33\%$ )、CDKN1C 中表达水平组(33%~67%)和 CDKN1C 高表达水平组( $\geq 67\%$ ),比较 3 组患者的生存率。

Western Blot 分析:提取蛋白质样品,制备电泳凝胶,进行 SDS-PAGE。电泳结束后将胶条割至合适大小,用转膜缓冲液平衡,进行半干式转移,PBS 洗涤后加入包被液,室温平稳摇动 2 h,弃包被液,洗膜,加入一抗,4℃放置 12 h 以上,弃一抗,洗膜后加入二抗室温平稳摇动 2 h,弃二抗,洗膜,加入显色液,避光显色至出现条带时放入双蒸水中终止反应。

1.3 统计学分析 本研究所有数据均采用 SPSS 18.0 统计分析软件进行处理与分析。组间计量资料使用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间计量数据比较采用 *t* 检验,组间计数资料率的比较采用  $\chi^2$  检验,生存率的分析采用 kaplan-meier 生存曲线,危险因素分析采用 Cox 风险模型。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MDS/AML 患者骨髓中 CDKN1C 的表达分析 MDS/AML 患者(*n*=125)骨髓 CD34+细胞中 CDKN1C mRNA 和蛋白表达水平显著高于健康对照组(*n*=20)(*t*=5.324, 7.326, *P*=0.002, 0.000),且与 BM 计数呈正相关(*r*=2.014, *P*=0.004),见图 1。



(A)MDS/AML 患者和健康人群骨髓 CD34+细胞中 CDKN1C mRNA 表达水平比较;(B)MDS/AML 患者和健康人群骨髓 CD34+细胞中 CDKN1C 蛋白表达水平。

图 1 MDS/AML 患者骨髓中 CDKN1C 的表达分析

2.2 不同 CDKN1C 的表达水平 MDS/AML 患者生存率比较 CDKN1C 高表达水平组患者的生存率显著低于 CDKN1C 低表达水平组和 CDKN1C 中表达水平组,数据比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2。

2.3 不同 CDKN1C 的表达水平 MDS/AML 患者临床资料分析 见表 1。CDKN1C 阳性表达组和 CDKN1C 阴性表达组患者年龄、性别、疾病分类、细胞遗传学风险、血细胞减少、BM 计数、治疗方法以及活组织检查至治疗时间等数据比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。

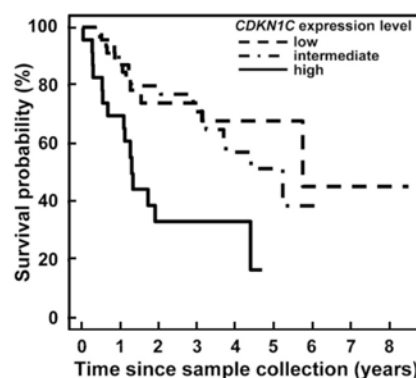


图 2 不同 CDKN1C 表达水平 MDS/AML 患者生存率比较

表 1 不同 CDKN1C 的表达水平 MDS/AML 患者临床资料分析

项目	CDKN1C 阳性表达组(n=40)	CDKN1C 阴性表达组(n=85)	$t/\chi^2$	P 值
年龄(岁)	66.3±5.1	65.2±4.6	1.160	0.384
性别[女(%)]	25(62.5)	53(62.4)	0.120	0.625
疾病分类			0.000	0.987
RA(RS)/RCMD	13(32.5)	27(31.8)		
RAEB1/RAEB2	15(37.5)	29(34.1)		
继发 AML	12(30.0)	29(34.1)		
细胞遗传学风险[n(%)]			1.021	0.272
差	16(40.0)	32(37.6)		
中	12(30.0)	35(41.2)		
高	12(30.0)	18(21.2)		
血细胞减少			0.045	0.845
0~1	17(42.5)	35(41.2)		
2~3	23(57.5)	50(58.8)		
BM 计数(%)	10.3±2.6	11.5±3.2	0.945	0.231
治疗方法			0.564	0.451
未治疗	12(30.0)	29(34.1)		
仅 HMA	8(20.0)	8(9.4)		
仅化疗	6(15.0)	15(17.6)		
仅 AlloSCT	5(12.5)	9(10.6)		
化疗后 AlloSCT	9(22.5)	24(28.2)		
活组织检查至治疗时间(月)	0.6±0.1	0.5±0.1	0.036	0.841

2.4 Cox 回归分析 MDS/AML 患者生存率影响因素 见表 2。Cox 回归分析结果显示高龄、高 BM 计数、细胞遗传学风险差以及 CDKN1C 阳性显著影响 MDS/AML 患者生存率,差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。

表 2 Cox 回归分析 MDS/AML 患者生存率影响因素

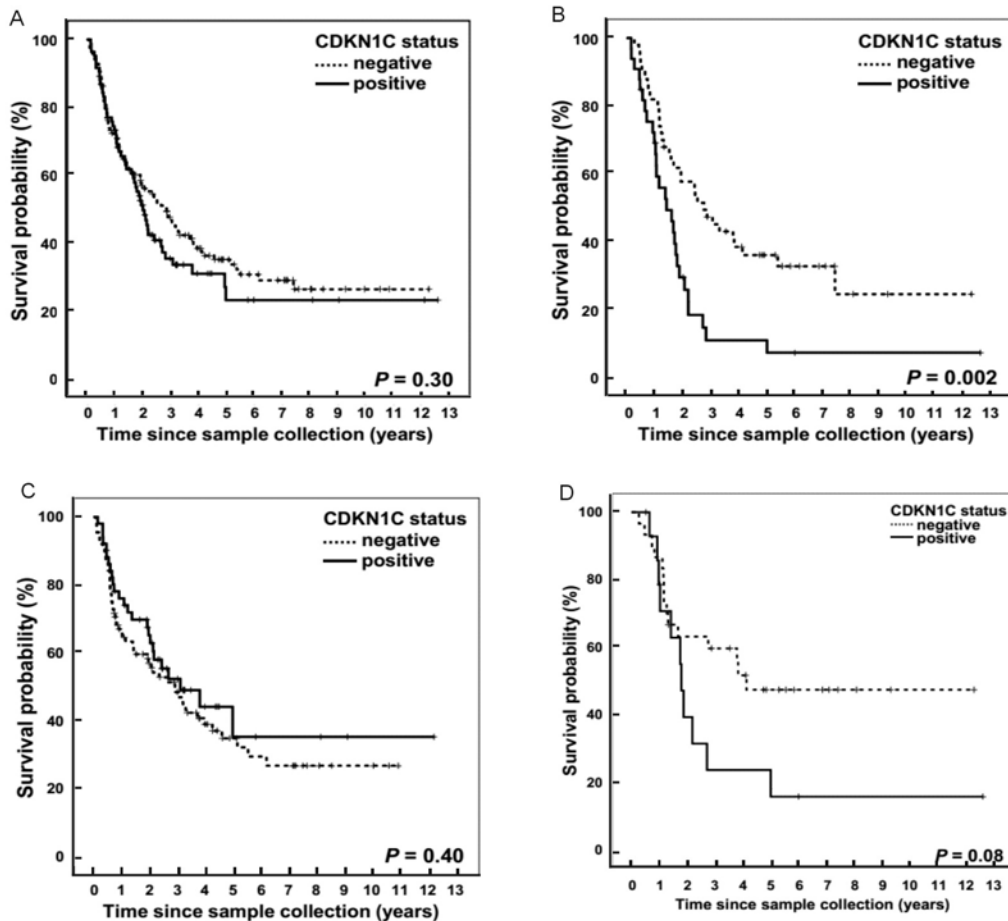
项目	HR	95%CI	P 值	
年龄(年)	5	1.20	1.10~1.32	<0.001
BM 比例	≥10% vs <10%	2.90	1.92~4.40	<0.001
细胞遗传学风险	差 vs 中或高	1.77	1.18~2.67	0.006
血细胞减少	≥2 vs <2	1.42	0.95~2.12	0.093
CDKN1C 状态	阳性 vs 阴性	1.54	1.03~2.32	0.034

2.5 治疗方法对不同 CDKN1C 表达水平 MDS/AML 患者生存率的影响 见图 3。MDS/AML 化疗的 CDKN1C 阳性表达组患者生存率显著低于 CDKN1C 阴性表达组患者,差异有统计学意义( $t = 5.314, P = 0.002 < 0.05$ )。

3 讨论 CDKN1C(也称 p57KIP2 或 CDKN1C/p57KIP2)属于 CIP/KIP 的细胞周期蛋白依赖酶家族抑制剂,能够紧密结合 CyclinA CyclinE-CDK2 复合物,抑制增殖。在实体肿瘤,降低 CDKN1C 表达水平,能够抑制细胞的增殖分化、迁移和入侵能力<sup>[7]</sup>。研究发现 CDKN1C 突变引起贝威二氏综合征,也易诱发癌症<sup>[8]</sup>。因此,可以认为 CDKN1C 是一个候选肿瘤抑制基因。本研究对

125 例 MDS/AML 患者研究发现 MDS/AML 患者骨髓 CD34+ 细胞中 CDKN1C mRNA 和蛋白表达水平显著增高 ( $P < 0.05$ ), 进一步对其生存率分析, 发现 CDKN1C 高表达水平组患者的生存率显著低于 CDKN1C 低表达水平组和 CDKN1C 中表达水平组 ( $P < 0.05$ )。在人体的造血系统, CDKN1C 是表达最为丰富的 CIP/KIP 家庭成员细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂, 并在维护成人造血干

细胞(HSC)中发挥主导作用, 作为一个至关重要基因, 参与 HSC 的自我更新和细胞周期静止<sup>[9]</sup>。此外, CDKN1C 被证明是下游中介 TGF- $\beta$  信号通路中一个关键的基因, 通过激活 TGF- $\beta$ , 参与 TGF- $\beta$  通路中诱导细胞周期阻滞, 而 TGF- $\beta$  信号通路的活性与 MDS 的发病机制相关性已经得到证实<sup>[10,11]</sup>。



(A) MDS/AML 患者 CDKN1C 阳性表达 ( $n=40$ ) 和阴性水平 ( $n=85$ ) 整体生存率比较; (B) MDS/AML 化疗患者 CDKN1C 阳性表达 ( $n=15$ ) 和阴性水平 ( $n=39$ ) 生存率比较; (C) MDS/AML 未化疗患者 CDKN1C 阳性表达 ( $n=25$ ) 和阴性水平 ( $n=46$ ) 生存率比较; (D) MDS/AML 化疗后 AlloSCT 患者 CDKN1C 阳性表达 ( $n=9$ ) 和阴性水平 ( $n=24$ ) 生存率比较。

图 3 治疗方法对不同 CDKN1C 表达水平 MDS/AML 患者生存率的影响

本研究通过 Cox 回归分析结果显示高龄、高 BM 计数、细胞遗传学风险差以及 CDKN1C 阳性显著影响 MDS/AML 患者生存率 ( $P < 0.05$ )。目前, 研究者已经关注细胞遗传学风险, 血细胞减少、年龄、依赖性输血和骨髓增殖数量对 MDS 生存率的影响, 这与本研究结果相一致<sup>[12]</sup>。而对于 AML 患者, 年龄和细胞遗传学最相关预后因素<sup>[13]</sup>, 在继发性 AML 患者中, 较差的细胞遗传学和从 MDS 转变为 AML 的时间被证明影响治疗效果, 所以在 MDS 时期, 可以选择更佳的治疗方式, 来获得最佳的治疗效果<sup>[14]</sup>。

本研究结果显示 MDS/AML 化疗的 CDKN1C 阳性表达组患者生存率显著低于 CDKN1C 阴性表达组患者 ( $P < 0.05$ ), MDS/AML 化疗后 AlloSCT 的 CDKN1C 阳性表达组患者生存率显著低于 CDKN1C 阴性表达组患者 ( $P < 0.05$ )。MDS 是处于前 AML 状态, 约 20%~40% 的患者发展为 AML。有研究发现化疗虽然能够抑制增殖, 但大多数患者复发或未能恢复造血作用, 很大程度上, 在治疗 MDS 时是低效的<sup>[15]</sup>。目前的癌症干细胞模式表明白血病干细胞(LSC)参与组织疾病发生发展, 且与原始 LSC 共同诱导后代产生不同的细

胞分化和自我更新的能力<sup>[16]</sup>。LSC 特点是在细胞周期中处于静止或休眠状态,而传统化疗的主要目标是快速分裂的细胞,因此,化疗对 LSC 的影响不大,LSC 可能倾向于逃避化疗,为疾病复发提供了有利条件。

综上所述,MDS/AML 患者骨髓中 CDKN1C 的表达显著增高,CDKN1C 高表达显著影响化疗 MDS/AML 患者的生存率。

#### 参考文献:

- [1] 冯秀梅,许洪志,张婧瑶,等.再生障碍性贫血、骨髓增生异常综合征和急性髓系白血病患者 CD4+T 细胞亚群转录因子表达的变化及其临床意义[J].中国实验血液学杂志,2014,22(4):1038-1042.  
Feng XM, Xu HZ, Zhang JY, et al. Expressive changes of CD4 + T cell subsets transcription factors in patients with aplastic anemia, myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia and their clinical significances[J]. Journal of Experimental Hematology, 2014, 22(4): 1038-1042.
- [2] Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management[J]. American Journal of Hematology, 2011, 86(1):97-108.
- [3] Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes [J]. Blood, 2012, 120(12): 2454-2465.
- [4] 华海应,高华强,朱文艳,等. Wilms 肿瘤基因在骨髓增生异常综合征与急性白血病患者骨髓细胞中的表达及其临床意义[J]. 江苏医药, 2015, 41(20): 2394-2396.  
Hua HY, Gao HQ, Zhu WY, et al. Expression and clinical significance of WT1 in bone marrow cells in patients with myelodysplastic syndrome and acute leukemia[J]. Jiangsu Medicine Journal, 2015, 41(20): 2394-2396.
- [5] Ferrara F. Conventional chemotherapy or hypomethylating agents for older patients with acute myeloid leukaemia? [J]. Hematological Oncology, 2014, 32(1):1-9.
- [6] Bertoli S, Bories P, Béné MC, et al. Prognostic impact of day 15 blast clearance in risk-adapted remission induction chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: long-term results of the multicenter prospective LAM-2001 trial by the GOELAMS study group[J]. Haematologica, 2014, 99(1): 46-53.
- [7] Craddock C, Quek L, Goardon N, et al. Azacitidine fails to eradicate leukemic stem/progenitor cell populations in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia[J]. Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America Leukemia Research Fund U K, 2013, 27(5): 1028-1036.
- [8] Schiller GJ. High-risk acute myelogenous leukemia: treatment today... and tomorrow [J]. Hematology, 2013, 2013(1): 201-208.
- [9] Will B, Zhou L, Vogler TO, et al. Stem and progenitor cells in myelodysplastic syndromes show aberrant stage-specific expansion and harbor genetic and epigenetic alterations[J]. Blood, 2012, 120(10): 2076-2086.
- [10] Brenet F, Kermani P, Spektor R, et al. TGFβ restores hematopoietic homeostasis after myelosuppressive chemotherapy [J]. Journal of Experimental Medicine, 2013, 210(3): 623-639.
- [11] Pellagatti A, Benner A, Mills KI, et al. Identification of gene expression-based prognostic markers in the hematopoietic stem cells of patients with myelodysplastic syndromes [J]. Journal of Clinical Oncology, 2013, 31(28): 3557-3564.
- [12] 卢丹,秦亚溱,李玲娣,等.骨髓增生异常综合征患者骨髓及外周血中 WT1 及 PRAME 基因的表达研究[J].中国实验血液学杂志,2014,22(2):370-376.  
Lu D, Qin YZ, Li LD, et al. Expression of WT1 and PRAME genes in bone marrow and peripheral blood samples of patients with myelodysplastic syndrome [J]. Journal of Experimental Hematology, 2014, 22(2): 370-376.
- [13] Starmans MH, Lieuwes NG, Span PN, et al. Independent and functional validation of a multi-tumour-type proliferation signature [J]. British Journal of Cancer, 2012, 107(3): 508-515.
- [14] 黄莹,文静,李虹颖,等. miR-550a-5p 在骨髓增生异常综合征中的表达及其靶基因预测[J].中国实验血液学杂志,2016,24(5):1476-1483.  
Huang Y, Wen J, Li HY, et al. Expression of miR-550a-5p in myelodysplastic syndromes and its prediction of target gene [J]. Journal of Experimental Hematology, 2016, 24(5): 1476-1483.
- [15] Zhou L, McMahon C, Bhagat T, et al. Reduced SMAD7 leads to overactivation of TGF-beta signaling in MDS that can be reversed by a specific inhibitor of TGF-beta receptor I kinase [J]. Cancer Res, 2011, 71(3): 955-963.
- [16] 吕远飞,闫振宇,陈乃耀,等.淋巴细胞亚群在再生障碍性贫血和低增生性骨髓增生异常综合征患者外周血中的表达分析[J].中国实验血液学杂志,2016,24(5):1505-1510.  
Lü YF, Yan ZY, Chen NY, et al. Analysis of lymphocyte subsets in peripheral blood of patients with aplastic anemia or hypoplastic myelodysplastic syndrome [J]. Journal of Experimental Hematology, 2016, 24(5): 1505-1510.

收稿日期:2017-06-17

修回日期:2017-09-05