



郑育声 著

急性白血病相关miRNA调控功能研究

Research on regulatory function of acute leukemia associated miRNA

miRNA

中国科学技术大学出版社



急性白血病相关miRNA调控功能研究

Research on regulatory function of acute leukemia associated miRNA

郑育声 著

miRNA



中国科学技术大学出版社

内 容 简 介

本书展现了急性白血病两种类型 ALL 和 AML 相关的 miRNA 表达谱,筛选了目前已初步鉴定与疾病发生相关的一些重要 miRNA,还揭示了 miR-100 在参与 AML 发病过程中通过调控 RBSP3 发挥的致癌作用通路。本书共 5 章,包括白血病、miRNA 的研究、研究 miRNA 表达谱的方法、miRNA 调控参与 B-ALL 发生、miRNA 调控参与 AML 发生。

本书既可作为高等学校生物及医学相关专业学生的研究生教材,也可作为生物及医学类学生的教学参考书。

图书在版编目(CIP)数据

急性白血病相关 miRNA 调控功能研究/郑育声著. —合肥:中国科学技术大学出版社,2016. 1

ISBN 978-7-312-03783-2

I. 急… II. 郑… III. 白血病—急性病—基因表达调控—研究 IV. R733.71

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 193926 号

出版 中国科学技术大学出版社
安徽省合肥市金寨路 96 号,230026
<http://press.ustc.edu.cn>
印刷 合肥市宏基印刷有限公司
发行 中国科学技术大学出版社
经销 全国新华书店
开本 710 mm×1000 mm 1/16
印张 13.75
字数 270 千
版次 2016 年 1 月第 1 版
印次 2016 年 1 月第 1 次印刷
定价 36.00 元

前 言

20 世纪 90 年代初, Lee 和 Wightman 等通过在线虫中分析发育时间突变体首次发现了 MicroRNAs (miRNAs)。然而直到 2001 年后, 才出现了集中研究这些调控性 RNAs 的专门领域, 随后科学家们在线虫、果蝇和哺乳动物中鉴别出大量内源表达的小 RNAs。在此后的 10 年里, miRNA 生物学研究获得了令人瞩目的成果, 取得了飞速的发展。我们现在已经知道哺乳动物基因编码了 300 种保守的 miRNA 基因, 高通量测序研究发现了 1000 个以上的另外的位点能够生成与 miRNAs 结构上相似的小 RNAs。尽管如此, 在哺乳动物各类小 RNAs 中, miRNA 似乎在疾病表型中起着独特的重要作用。

急性白血病是造血系统的恶性肿瘤, 是造血细胞的某一系列在骨髓中恶性增生, 并进入血流浸润各组织器官, 引起的一系列临床表现。与其他疾病相似, 白血病往往是由于对生理和病理应激做出的异常或不适当的反应所致。在过去的 10 年里, 大量的研究揭示了部分 miRNAs 参与调控了这些情况下的细胞行为, 如一些 miRNA 起癌性基因或抑癌基因作用, 其变异导致细胞发育异常或产生癌变。这些发现引起了全世界的关注, 有关 miRNA 研究的发展快速而惊人。

本书包括了白血病的分型、miRNA 的起源和特性以及分析方法, 包括生物信息学和传统实验操作方法, 并记录了 miRNA 在急性白血病发生过程中发挥作用的研究成果。初学者可以通过此书充分了解 miRNA 在白血病中的功能研究。

迄今为止,尚未有一本能够对白血病相关的 miRNA 生物学功能研究进行详尽介绍的书籍出版。本书记载了近些年来有关 miRNA 在急性白血病发生中的研究结果,展现了 miRNA 在白血病发生中的“多才多艺”,让读者更好地了解当前所面对的还没解决的问题和技术挑战,期待在未来的研究中出现更多、更大的发现,并提出更多重要的原理法则。

由于 miRNA 在急性白血病中的功能相当复杂,目前领域的研究还处于不断探索的过程中,加之编者所涉及领域有限,在本书的编撰过程中难免有不妥和疏漏之处,恳请读者提出宝贵意见,以利于不断修改和完善。

本书的编撰和出版工作得到了中山大学陈月琴教授、海南大学李东栋教授和中国科学技术大学出版社的大力支持和无私帮助,在此作者表示由衷的感谢。

郑育声

2015 年 3 月

目 录

前言	(i)
第 1 章 白血病	(1)
1.1 白血病简介	(1)
1.2 白血病的类型	(2)
1.3 白血病的流行病学及存在问题	(7)
第 2 章 miRNA 的研究	(11)
2.1 miRNA 的发现	(11)
2.2 miRNA 的生物起源	(11)
2.3 miRNA 作用机制	(13)
2.4 miRNA 特性	(16)
第 3 章 研究 miRNA 表达谱的方法	(31)
3.1 寻找 miRNA 的方法	(31)
3.2 寻找 miRNA 靶基因的方法	(36)
第 4 章 miRNA 调控参与 B-ALL 发生	(40)
4.1 ALL 相关的 microRNA 的挖掘	(40)
4.2 miR-155 促进急性 T 淋巴细胞系(Jurkat)增殖和凋亡	(67)
4.3 miR-509 调控 RAB5C 抑制人前-B 急性淋巴细胞性白血病	(69)
4.4 miR-142-3p 通过糖皮质激素受体- α 和 cAMP/PKA 通路在 T-ALL 中 发挥致癌作用	(77)
4.5 miR-125b-1 调控参与 ALL 发生	(87)
第 5 章 miRNA 调控参与 AML 发生	(90)
5.1 miR-100 参与 AML 细胞的分化和增殖	(92)

5.2	miR-181b 在急性髓性白血病多药耐药中的作用机制	(112)
5.3	miR-29b/AF1q/CD44 作用轴调控急性髓性白血病多药耐药性的机制研究	(125)
5.4	肿瘤抑制因子 miR-34a 靶向 PD-L1 在急性髓性白血病细胞中发挥潜在的免疫治疗作用	(146)
5.5	miR-17 参与调控核心结合因子(CBF)急性髓细胞性白血病的 RUNX1-miRNA 机制	(156)
5.6	miRNA 在白血病治疗中的潜在价值	(167)
附录 1	缩略词表(一)	(169)
附录 2	缩略词表(二)	(171)
附录 3	常用试剂配方	(172)
附录 4	研究材料和实验方法	(176)
F4.1	研究材料	(176)
F4.2	实验方法	(180)
F4.3	使用的数据库和软件	(186)
参考文献		(188)

第1章 白血病

1.1 白血病简介

白血病(Leukemia)是一种造血组织的恶性疾病,是一组高度异质性的恶性血液病,俗称“血癌”。正常情况下,造血干细胞可分为定向髓红系干细胞和淋巴系干细胞。髓红系干细胞可分化为红细胞的红系干细胞,又可分化为粒细胞和单核细胞的粒-单核干细胞系,还可分化为血小板的髓系干细胞系(见图 1.1)。白血病是某一类型的血液细胞分化成熟障碍并在骨髓或其他造血组织中的肿瘤性增生,有明显的质(形态和功能)和量的异常,并广泛浸润体内各器官、组织,抑制正常的造血功能,使各个脏器的功能受损,临床上出现不同程度的贫血,出血,发热及肝脾、淋巴结肿大等症状和体征^[1]。

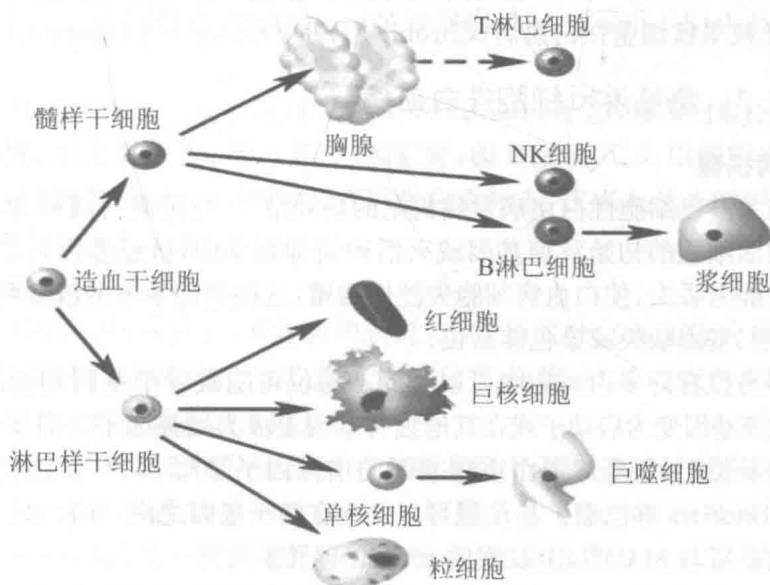


图 1.1 造血干细胞分化过程示意图

1.2 白血病的类型

1.2.1 按病程缓急和细胞分化程度分类

依据病程缓急和细胞分化程度,可将白血病分为急性及慢性两大类。急性白血病(Acute Leukemia, AL)病程急,自然病程一般仅几个月。骨髓及周围血中以异常原始及早期幼稚细胞为主。慢性白血病(Chronic Leukemia, CL)病程较缓慢,自然病程一般为数年。骨髓及周围血中以异常的成熟细胞为主,伴有幼稚细胞^[2]。

1.2.2 按白细胞形态和生化特征分类(Franch-American-Britain, FAB 分型)

根据白细胞形态和生化特征,急性白血病分为急性淋巴细胞性白血病(Acute Lymphoblastic Leukemia, ALL)和急性髓细胞性白血病(Acute Myeloblastic Leukemia, AML)两大类。慢性白血病分为慢性淋巴细胞性白血病(Chronic Lymphocytic Leukemia, CLL)、慢性粒细胞性白血病(Chronic Myeloid Leukemia, CML)、慢性粒单核细胞性白血病(Chronic Myelomonocytic Leukemia, CMML)。

1.2.2.1 急性淋巴细胞性白血病

1. 发病机理

根据有关淋巴细胞性白血病发病机制的研究结果,可推测有两种,即获得性遗传损伤可激活细胞的初始致癌基因或灭活肿瘤抑制基因(抗癌基因);二者均可导致肿瘤监控能力丢失,使白血病细胞失控性增殖,这些遗传学上的改变可以为点突变、基因扩增、基因缺失或染色体易位。

染色体易位在许多白血病中可以见到。易位可隐藏一个基因到新的位置,使新的初始致癌基因变为启动子或在其他独特基因上成为增强因子。例如在 t(8;14) 这个染色体易位上,免疫球蛋白重链基因的增强因子是与 MYC 基因接近的并列成分,导致 Burkitts 淋巴瘤。易位也可以发生在两个基因之内,导致基因重排和嵌合蛋白,如在 ALL 和 CML 上发现的 t(9;22) 易位。

混合白血病(Mix Line Leukemia, MLL)基因重排和 11q23 异常可以发生在淋巴系和髓系白血病,如 Ph 染色体可以在 Ph 染色体阳性 ALL 的髓系或红细胞

系的早期细胞中检出提示在 ALL 患者,除淋巴系统外可累及多系造血干细胞。

2. 形态学分型

国际通用 FAB 分型,即按照细胞大小、核浆比例、核仁大小及数目、胞浆嗜碱程度将急性淋巴细胞性白血病分为 L1~L3 三型。小儿 ALL 以 L1 型最多见,约占 70%,L2 型约占 25%,L3 型仅占 0~4%。

第一型(L1):原始和幼稚淋巴细胞以小细胞(直径 $<12\mu\text{m}$)为主,核圆形,偶有凹陷与折叠。染色质较粗,结构较一致,核仁少而小,不清楚,胞质少,轻或中度嗜碱。过氧化物酶或苏丹黑染色阳性的原始细胞一般不超过 3%。

第二型(L2):原始和幼稚淋巴细胞以大细胞(直径可大于正常小淋巴细胞 2 倍以上, $>12\mu\text{m}$)为主,核形不规则,凹陷和折叠可见。染色质较疏松,结构较不一致,核仁较清楚,一个或多个;胞质量常较多,轻或中度嗜碱,有些细胞深染。

第三型(L3):似 Burkitt 型,原始和幼稚淋巴细胞大小较一致,以大细胞为主,核形较规则。染色质呈均匀细点状,核仁明显,一个或多个,呈小泡状;胞质量较多,深蓝色,空泡常明显,呈蜂窝状。

3. 免疫学分型

根据白血病细胞表面不同的分化抗原,采用单克隆抗体及流式细胞仪,可以诊断 ALL 并将其分为不同亚型。通常分为 B、T 细胞系。

(1) B 细胞系 ALL。

根据 B 细胞发育阶段分为早 B 前体细胞 ALL(Early pre-B、Pre-pre-B 或 Pro-B ALL)、普通细胞 ALL(Common ALL)、前 B 细胞-ALL(Pre-B ALL)、B 细胞 ALL(B-cell ALL)。

早 B 前体细胞 ALL 主要表达 HLA-DR、TdT、CD19,有免疫球蛋白重链基因重排。

普通细胞 ALL 特征为 CD10 阳性,预后好;前 B 细胞 ALL 以胞质出现免疫球蛋白为标志,B 细胞 ALL 以出现膜免疫球蛋白为标志,在成人及儿童中均少见,在 FAB 分型中通常为第三型。

(2) T 细胞系 ALL。

在成人中占 15%~25%,所有病例表达 CD7,根据分化程度分为早 T 前体细胞 ALL(Pre-T)和 T 细胞 ALL(T-ALL),部分 T 细胞 ALL 可表达 CD10。多数 T-ALL 具有 T 细胞受体基因重排。

多数白血病抗原缺乏特异性,因此在诊断和区分不同亚型时应采用一组单克隆抗体,至少包含一种高敏感的标志(如 B 细胞系为 CD19,T 细胞系为 CD7,髓系为 CD13、CD33)以及一种高度特异性的标志(如胞质 CD79a 对于 B 细胞、胞质 CD3 对于 T 细胞、胞质髓过氧化物酶对于髓系细胞),据此可以诊断 99% 的 ALL。

(3) 非 T 非 B 急淋及其亚型。

(4) 病理变化。

ALL 的基本病理变化主要表现为白血病细胞的增生与浸润,此为白血病的特异性病理变化,除造血系统外,其他组织如肝脏、脑、睾丸、肾脏等亦出现明显浸润和破坏。

骨髓、淋巴结、肝、脾是最主要的累及器官。骨髓大多呈明显增生,白血病细胞呈弥漫性片状增生及浸润,伴不同程度的分化成熟停滞。全身骨髓均有白血病细胞增生浸润,椎骨、胸骨、盆骨及肋骨的浸润最为明显。少数患者骨髓增生低下,可伴程度不一的纤维化。淋巴结肿大较为多见(约 70%),一般为全身性或多发性的淋巴结肿大,淋巴结被累及的早期,淋巴结结构尚可辨认,白血病细胞往往仅累及淋巴结的某一区域,出现片状均一性幼稚细胞增生浸润,淋巴索增宽、窦变窄,初级滤泡或次级滤泡受挤压而萎缩,晚期淋巴结结构完全被破坏。脾脏均有不同程度肿大,镜下骨髓有白血病细胞弥散浸润,可波及红髓与血窦,肝内白血病细胞主要浸润门脉区及其周围,造成肝大。扁桃体、胸腺也常被侵及。ALL 胸腺受累占 78.5%,其中以 T-ALL 最常见。被浸润的胸腺增大,临床表现为纵隔肿块,尤其儿童 T-ALL 时肿大较为显著。

神经系统是白血病浸润的常见部位,ALL 合并中枢神经系统损害较其他类型白血病多见,病理改变主要为脑膜及脑实质白血病细胞的局限性或广泛性浸润,可伴有出血、水肿、脊髓膜炎及硬膜外肿物形成的横段性脊髓炎。蛛网膜下隙受侵常见,脑实质的累及部位依次为大脑半球、基底节、脑干及小脑,病变部位白血病细胞呈弥散性或结节状浸润,浸润周围白质组织明显水肿和坏死,大约 20% 的中枢神经系统白血病(CNS-L)患者有脑神经麻痹,以面神经(VII)麻痹最多见,其次为外展(VI)、动眼(III)、滑车(IV)神经,而脊髓及周围神经受累罕见。

ALL 侵犯睾丸较为常见,特别是儿童 ALL,睾丸间质中可见大量白血病细胞浸润,压迫精曲小管引起萎缩,临床表现为睾丸单侧或双侧无痛性肿大,坠胀感。白血病细胞浸润阴茎海绵体或因白血病细胞在静脉窦内淤积、栓塞,血流受阻或血栓形成时可引起阴茎持续异常勃起。ALL 累及肾脏者,肾包膜下可见灰白色斑点或结节以及出血点,肾盂出血点也较常见。皮、髓质散在灰白色小结节。镜下见皮、髓质散在或灶性白血病细胞浸润,肾小球及肾小管上皮受压萎缩或变性坏死。

1.2.2.2 急性髓细胞性白血病

目前,AML 发病机制尚不清楚。从染色体及基因水平可能存在以下机制:

(1) 染色体异常。AML 的染色体异常,像急性淋巴细胞性白血病一样,可分为两大类:① 染色体结构异常,如染色体结构中某一部分缺失(Del)、重复(Dup)、

倒位(Inv),或两个染色体中的某一结构(基因)断裂相互易位(t)形成融合基因;②染色体数量的改变,如某一染色体的长臂或短臂缺失(-p,-q)或增加(+p,+q)。

(2) 染色体及基因异常与 AML 分子发病机制的联系。大多数 AML 是由于获得性造血干细胞或祖细胞的基因突变所致,只有极少数是遗传或家族性的造血干、祖细胞基因突变,多数原因不明。已知的原因有放射线接触,某些化学物质的作用,尤其是化疗药物如烷化剂、拓扑异构酶 II 抑制剂(如足叶乙甙(VP-16))等。由于治疗所引起的 AML 称为 t-AML,近年来报道增多。少数 AML 的发病机制是由于基因突变加快 DNA 修复缺陷、DNA 复制错误所致。

基因的突变可表现为染色体的异常,后者的本质是基因组的某一核苷酸序列发生断裂或突变。

1. 融合基因

与 AML 发病机制研究得较多和了解得比较清楚的基因及其融合基因有以下 3 种:

(1) 第 11 号染色体 q23:涉及的基因名为 MLL(髓—淋白血病基因),MLL 正常表达于脾、肝、肺、心脑、T 及 B 淋巴细胞。由于它与果蝇的 TRITHORAX 蛋白有同源性,故又称为 HTRX 或 HRX 基因。通过基因相互易位而与 MLL 融合的基因不下 30 个。正常时 MLL 是一种转录因子。在 AML 中,MLL 与其配对的基因融合有的已经克隆。融合基因使 MLL 的正常基因转录调节发生障碍,可能是引起 AML 及其表型(常见 M4、M5 型)特点的机制。

(2) 第 21 号染色体 q22:涉及的基因名为 AML1。AML1 正常表达在造血细胞,它是核心结合蛋白(CBL)的亚单位通过一个名为 RHD(runt 同源区域)与 CBF α 形成一种复合物,后者有利于 CBF 结合在 DNA 上。AML1-CBF 复合物是一种转录因子,与共激活因子 ATEF/CREB 及 P300/CBP 以及 DNA 结合蛋白 LEF-1 及其接头的蛋白 ALY 一起,形成复合转录因子,调节 IL-3、髓过氧化物酶、T 细胞受体、GM-CSF 受体(CSF-1R)。这些受体通过 AML1 结合在 DNA 上,正常时起转录激活作用。若与 GROUCHO 或 EAR-2 蛋白结合,则在正常情况下起转录抑制作用,ETO 表达于大脑中的某些细胞、CD34⁺造血祖细胞。在 t(8;21)(q22;q22)中,AML1 与 ETO 结合形成融合基因。ETO 募集核的共抑制物 Sin3AN-CoR 以及它们结合的组蛋白去乙酰化酶(HDAC),抑制 AML1 的转录激活作用,这一 AML1-ETO 与核抑制物的复合物不仅能抑制 AML1 的正常功能,而且也抑制 ETO 的功能,因而扰乱 AML1 的转录调节作用,这可能是 M2b 型 AML 的发病机制。

(3) 维 A 酸受体 α (RAR α)及早幼粒细胞白血病(PML)基因。

2. 非融合基因

(1) p53 基因定位于人染色体 17p13.1,编码 53kD 的蛋白。人 p53 蛋白由 393

个氨基酸组成,含有 4 个功能区。野生型 p53 蛋白是核内的一种磷酸化蛋白,作为转录因子可与特异的 DNA 序列相结合,一定的外界刺激如 DNA 损伤、应激等可引起胞内 p53 蛋白水平升高,激活一系列下游靶基因的转录,抑制细胞周期的进行或诱导凋亡。已知的靶基因至少有 7 个。p53 基因抑癌功能丧失是恶性肿瘤最常见的现象之一。在血液恶性肿瘤中,p53 基因失活与 CML 急变的关系受到重视。最近有研究者发现 CML 中 p53 基因的结构和表达异常、等位基因缺失重组或点突变约见于 25% 的 CML 急变患者。

(2) nm23 基因存在 nm23-H1 和 nm23-H2 两种亚型,位于人类染色体 17q21.3,相距 4 kb,均含有 5 个外显子。两种亚型位于外显子—内含子连接区的大部分切割位点是一致的。nm23 基因编码一个 17kD 蛋白,两种基因亚型编码的蛋白质分别与核苷二磷酸激酶(Nucleoside Diphosphate Kinase,NDPK)的 A、B 亚单位相对应,NDPK 影响细胞的发育、增殖、分化及运行调节。而 nm23-H1 和 nm23-H2 的一个等位基因失活可能导致 NDPK A、B 亚单位比例的失衡,引起细胞活动的改变,促进肿瘤的浸润及转移过程。nm23 基因在一些肿瘤中表达下降与高转移潜力有关,在血液病中则作为一种分化抑制因子基因参与疾病的发生、发展过程,但人们尚未确切阐明 nm23 基因如何参与白血病的发生,促进白血病细胞的增殖和对细胞分化的调控作用。

(3) BCL2 是控制细胞凋亡基因家族中的一员。定位于人类染色体 18q21.3,由 3 个外显子组成,编码 229 个氨基酸组成的膜蛋白,具有抗凋亡作用,BCL2 可与 BAX 形成异二聚体。BCL2/BAX 比率是影响细胞凋亡的关键,若 BCL2 表达高,则抑制细胞凋亡,反之若 BAX 表达高,则促进细胞凋亡。体外实验显示,BCL2 表达增高能使白血病细胞抵抗糖皮质激素、VP-16、柔红霉素、米托蒽醌等药物所诱导的凋亡,同时研究者发现 BCL2 高表达明显延长白血病细胞生存时间,抑制或阻断多种因素包括 p53、c-myc、化疗药物、撤除生长因子等所触发的细胞凋亡。另外,BCL2 家族与白血病耐药有关,高表达 BCL2 的白血病细胞对化疗药物不敏感、预后差。

(4) p16 是重要的抑癌基因,位于染色体 7p21,编码 16kD 蛋白,又名多肿瘤抑制基因。p16 蛋白抑制细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4 和 6,是细胞 G1/S 期转换的关键调控基因。Hebert 等报道 p16 基因缺失、突变在急性 T 淋巴细胞白血病(T-ALL)检出率最高,达 22/24,在前 B 细胞白血病 p16 基因缺失检出率为 11/53,但在 AML 中 p16 基因缺失、结构改变等异常相对少见,提示在造血系统恶性肿瘤的发生和演变中 p16 具有不同的作用。

(5) WT1 与肾母细胞瘤(Wilm's Tumor,WT)相关。有实验证实,WT1 是人早期生长反应基因(EGR1)的功能拮抗蛋白,WT1 表达限于肾脏和泌尿生殖系统

前体细胞,可能通过阻滞 EGR1 的促增殖作用,间接促进细胞分化而起抑癌作用。WT1 基因与血液系统恶性肿瘤的关系不甚清楚,但发现白血病细胞常表达 WT1。

(6) 其他基因: FMS 编码 CSFI 受体,其突变及等位基因缺失可能在某些白血病的发病中具有重要作用,如 FMS 突变在 M5 型 AML 中发生率高。RAS 基因突变在 AML 中的发生率可达 30%,抑癌基因——RB 基因失活在各型白血病的发生率为 10%~30%。但上述各种单基因异常与 AML 的发病分子机制之间的关系尚待进一步阐明。

3. 形态学分型

AML 分为 7 型。AML-M1: 原始粒细胞白血病为分化型,原始粒细胞 $\geq 90\%$ 。AML-M2: 原始粒细胞白血病部分分化型,其中,AML-M2a: 原始粒细胞在 30%~90%之间,单核细胞 $< 20\%$; AML-M2b: 骨髓粒系明显增生,异常原始及早幼粒细胞明显增多,以异常的中性中幼粒细胞增生为主,通常 $> 30\%$ 。AML-M3: 急性早幼粒细胞白血病,骨髓中以颗粒增多的异常早幼粒细胞增生为主,通常 $> 30\%$,其中,AML-M3a: 粗颗粒型; AML-M3b: 细颗粒型。AML-M4: 粒—单核细胞白血病,其中,AML-M4a: 以原始及早幼粒细胞增生为主,原、幼单及单核 $> 20\%$; AML-M4b: 以原、幼单核细胞增生为主,原粒+早幼粒细胞 $> 20\%$; AML-M4c: 具有粒系及单核系特征的原始细胞 $> 30\%$; AML-M4Eo: 除上述特征外,有颗粒粗大且圆、着色较深的嗜酸性粒细胞,占 5%~30%。AML-M5: 单核细胞白血病,其中,AML-M5a: 分化型,骨髓原单核细胞 $\geq 80\%$; AML-M5b: 部分分化型,骨髓原始和幼稚单核细胞 $> 30\%$,原始单核细胞 $< 80\%$ 。AML-M6: 红白血病,骨髓中红细胞系 $\geq 50\%$,伴有形态学异常;原粒细胞(或原单+幼单核细胞) $> 30\%$ 。AML-M7: 巨核细胞白血病,外周血有原巨核细胞;骨髓中原巨核细胞 $> 30\%$ ^[3,4]。

1.3 白血病的流行病学及存在问题

白血病是危害人类健康、致命的恶性肿瘤,是国内十大高发恶性肿瘤之一。在我国白血病发病率约为 3/10 万人口~4/10 万人口,每年新增约 4 万名白血病患者,占肿瘤发病率的第六位,男性和女性分别占各年龄组恶性肿瘤病死率中的第六位和第八位。任何年龄均可发病,多发于青少年,是 35 岁以下发病率、病死率最高的恶性肿瘤。分析白血病年龄发病率曲线,发现 5 岁以下及 15~20 岁之间有两个小高峰。40 岁以后随年龄增长发病率逐渐增高,高峰年龄在 60 岁以后,但各型白血病发病年龄不尽相同。根据调查发现,白血病的发病率城市高于农村,油田和污

染地区的发病率明显增高,且男性高于女性。就各型白血病来看,急性发病率高于慢性(占70%左右),其中又以AML最高,其次为ALL、CML、CLL和特殊类型最低,且急性白血病发病急、发展快、病死率高,因而急性白血病的危害更大^[5]。

1.3.1 急性白血病的治疗现状及存在的问题

除输血和抗感染等对症支持治疗外,联合化疗是当前主要的治疗方法。由于新的有效化疗药物的不断涌现和联合用药方法的改进,尤其是造血干细胞移植技术的应用,现在白血病患者的存活率大为改观,儿童ALL可以获得80%的长期生存,AML患者的预后也得到明显改善。另外,分化诱导剂维甲酸等可使早幼粒白血病细胞(Acute Promyelocytic Leukemia, APL)分化诱导成熟,疗效显著,是近年来的重要发现。但是,总体治疗效果不令人满意,仍有一些问题尚待解决^[6]。

1.3.2 诊断存在的问题

急性白血病患者确诊后才能够分型治疗,初诊时最基本的检查是骨髓细胞形态学,但形态学诊断存在较大的主观性,判断符合率较低(64%~77%)。细胞化学染色在一定程度上弥补了单凭形态学对细胞辨认的不足,对ALL和AML的鉴别、AML各亚型间的鉴别更为可靠。目前多数医院均可进行这两项检查,但由于经验问题,诊断水平差异很大。由于诊断的不确定,导致急性白血病的治疗水平参差不齐。分子生物学技术的发展、应用,尤其是对染色体易位形成融合基因的检出更能反映急性白血病的生物学本质,从而提出MICM分型方案。在2001年3月的里昂会议上,国际血液学及血液病理学专家推出一个造血和淋巴组织肿瘤WHO新分型方案,该分型将FAB分型与MICM分型技术结合,力求反映疾病的本质。WHO分类中诊断AML的血或骨髓原始细胞下限从30%降为20%;当患者被证实有克隆性、重现性细胞遗传学异常 $t(s;22)(q22;q22)$ 、 $inv(16)(p13;q22)$ 或 $t(16;16)(p13;q22)$ 以及 $t(15;17)(q22;q21)$ 时,即使原始细胞 $<20\%$,也应诊断为AML。WHO关于淋巴系统恶性肿瘤的分类有较大变化,急性淋巴细胞白血病仅分为前体B-急性淋巴细胞白血病/原始淋巴细胞淋巴瘤(前体B-ALL/B-LBL)和前体T-急性淋巴细胞白血病/原始淋巴细胞淋巴瘤(前体T-ALL/T-LBL),认为急性淋巴细胞白血病和前体淋巴细胞肿瘤是同一疾病的两种不同临床表现,骨髓中幼稚细胞25%时诊断为急性淋巴细胞白血病,幼稚细胞25%时诊断为前体淋巴细胞淋巴瘤。目前,仅有少数大型医疗机构(尤其是血液科学术力量较强的单位)可以依据WHO的标准开展相关检查,绝大多数医院还不能开展如细胞遗传学、免

疫分型、分子生物学等检查。要求多数医院均开展上述项目尚不现实,也会造成贵重仪器的闲置、浪费,病例资料的分散^[4]。

1.3.3 治疗方案上存在的问题

1. ALL 治疗现状及存在问题

ALL 是白血病中最常见的亚型,是一种淋巴细胞祖细胞恶性增生的疾病,以染色体异常为主要特征,在任何年龄段都可发生,以 2~5 岁为发病率高峰,发病率约为小儿白血病的 75%^[6,7]。虽然随着现代治疗手段的不断改进,儿童 ALL 的五年无病生存(EFS)率已高达 80%^[8],但是,低于 60 岁的成人 ALL 患者的长期生存率不及 40%,60 岁以上的甚至小于 10%,更严重的是,随着完全缓解(Complete Remission, CR)率和无病生存期的延长,髓外白血病特别是中枢神经系统白血病(Central Nervous System Leukemia, CNSL)的发生率明显增加。

ALL 中较为特殊的类型包括:(1)成熟 B-ALL(Burkitt 型)——该类型的细胞增殖速度快;髓外浸润显著,易发生 CNSL;发病时肿瘤负荷大,治疗后易发生肿瘤溶解综合征,既往采取与 T-ALL、前体 B-ALL 相同的治疗策略,缓解率不低,但 CR 期及生存期均非常短。近年来借鉴儿童患者治疗经验,采用特殊短程强烈化疗,取得了可喜的疗效。这一治疗理念尚未被多数国内学者接受采纳,治疗仍以治疗一般 ALL 的方案为主。因此,长期疗效仍不理想。(2)Ph 染色体(+)是成人 ALL 较常见的细胞遗传学异常,其发生率随年龄增长逐渐增加,儿童<5%,成人为 15%~30%,老年患者可达 50%。Ph(+)/BCR-ABL(+)是儿童和成人 ALL 最不良的预后因素之一。尽管多数患者可获缓解(CR 率>60%),但缓解时间通常短暂(中位 8 个月),2~3 年 LFS 0~15%。异基因(Allogeneic)BMT 是目前唯一可治愈 Ph(+)/BCR-ABL(+)ALL 的方法,但同 Ph(-)/BCR-ABL(-)ALL 比较,疗效仍较差,主要是复发率、治疗相关死亡率较高。GHVE(酪氨酸激酶抑制剂)对这类病例有效,但国内限于经济原因,应用尚未普及^[4]。

中枢神经系统白血病,也称“脑白”,是白血病细胞侵犯中枢神经系统后,由于血脑屏障的存在使得药物无法有效到达中枢神经,进而导致的一种髓外白血病。研究表明,大约有 2%~10%的 ALL 患者发生中枢神经系统(Central Nervous System, CNS)白血病,复发率高达 10%~30%^[9]。有研究表明,儿童 ALL 初诊时约 5%的患者发生中枢神经系统白血病;在成人初诊 ALL 中,中枢神经系统白血病的发生率也较低,如果在初诊早期不进行 CNSL 的预防性治疗,约 50%的成人 ALL 将会发生 CNSL 复发,儿童 ALL 中 CNSL 的复发率则超过 50%。而且,ALL 患者一旦出现 CNSL 复发则预后很差,平均生存期仅 6 个月。因此,CNSL

的早期诊断与预防是非常重要的^[10]。

然而,目前白血病治疗中最大的难题是无法对 CNSL 复发的危险度进行准确的评估,以及抗肿瘤药物或颅脑放疗的副作用,如神经毒素造成结束治疗后长期的神经认知功能障碍等^[11],导致临床治疗中 CNSL 的预防性治疗与控制不能有效地进行,传统的化疗方案只能治愈 30% 的复发病人^[12,13]。

因此,CNSL 的早期诊断与建立新的治疗方法对有效预防 CNSL 的复发和提高 ALL 存活率具有重要的意义,而具备用于准确预测病人复发危险因素的分子标记是建立有效治疗方案的前提^[14]。

2. AML 治疗现状及存在问题

国际上 AML 患者治疗的现状是:(1) 阿糖胞苷+蒽环(DNR、IDA)或蒽醒(MTZ)类化疗药组成的方案依然是绝大多数各年龄段 AML 患者的标准诱导缓解治疗方案。(2) 年轻患者可从多疗程的强烈巩固治疗中受益。(3) 伴中等危险组或高危组细胞遗传学异常的患者应考虑造血干细胞移植,利用 GVL 效应达治疗目的。(4) 老年患者目前尚无标准的缓解后治疗策略:标准剂量和中剂量(1~1.59/mZ)阿糖胞苷均可考虑,但尚未发现哪种治疗更有益。

目前越来越多的研究报告认为 AML 应根据危险度分组治疗。AML 相关的危险因素有许多,如细胞遗传学/分子生物学、FLT3 突变、NPM、BAALC、WTI 等,其中获公认、应用最广的是根据细胞遗传学/分子生物学进行危险度分组。根据细胞遗传学分组后,AML 的 CR 率为 40%~90%,治愈率为 10%~70%。而且发现大剂量阿糖胞苷(HD-AraC)对预后良好组更有价值(至少应用 3 个疗程)^[4]。

近年来,随着化疗方案的不断改进以及新的化疗靶向药物的发现,治疗效果已经有了明显改善,但仅有大约 40% 的 AML 患者能够获得长期生存率^[16-18],主要由于传统的化疗难以清除微小残余病变,复发率较高,长期无病生存率低。造血干细胞移植虽然能够延长患者生存期(移植后年无病生存率可达到 50%~60%),但由于骨髓供体来源有限和经济等原因,难以得到广泛推广。另外,化学疗法对老年患者缓解率小于 10%,因为 5 号和 7 号染色体细胞遗传学异常往往导致老年病人无法取得良好的化疗效果^[17]。

急性早幼粒细胞白血病(APL),又称 AML-M3 型,是 AML 中较特殊的一个类型,90% 以上的 APL 患者有特异性染色体易位 $t(15;17)(q22;q21)$,95% 以上的患者可检测到 PML/RAR 融合基因。治疗方法包括:化疗、全反式维甲酸(ATRA)、三氧化二砷、造血干细胞移植(SCT)。致病基因为 15 号染色体(PML)基因和 17 号染色体维甲酸 A 受体易位而形成的 PML-RARA 融合蛋白,少数患者有变异型易位,从形态上和典型 APL 难以区别,这些变异型包括 *PLIF*, *NMP*, *NUMH* 和 *STAT5b*。除 *PLIF* 基因外,其他的基因均对 ATRA 不敏感^[19,20]。