

## BAALC 蛋白在急性白血病中的表达及其临床意义

董小林, 张少君, 邱桂华, 廖雪梅, 杨洁

(湖北医药学院附属人民医院健康体检中心, 湖北 十堰 442000)

**【摘要】** 目的 探讨脑和急性白血病胞质(Brain and acute leukemia cytoplasmic, BAALC)蛋白在急性髓细胞性白血病(Acute myeloid leukemia, AML)的表达及其临床意义。方法 采用 Western blot 方法半定量检测 BAALC 蛋白在 58 例 AML 患者(初诊 24 例、完全缓解 28 例和复发 6 例)的骨髓单个核细胞(Bone marrow mononuclear cells, BM-MNCs)的表达水平, 15 例非恶性血液病患者以及 AML 细胞系 KG1 $\alpha$  和 HL-60 分别作为阴性和阳性对照。结果 KG1 $\alpha$  和 HL-60 细胞 BAALC 均为阳性高表达, 非恶性血液病对照者 BAALC 表达均为阴性。BAALC 阳性率在 AML 初诊组(83.3%)与复发组(100%)均高于完全缓解(CR)组(7.1%)和阴性对照组(0) ( $P < 0.001$ ); AML 初诊组和复发组的 BAALC 蛋白相对含量明显高于 CR 组和阴性对照组 ( $P < 0.01$ ), 且 CR 组和阴性对照组之间 BAALC 表达阳性率和相对含量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 BAALC 蛋白在 AML 中表达水平异常增高, 提示 BAALC 可能与 AML 的发生发展密切相关。

**【关键词】** 急性髓系白血病; BAALC; 完全缓解

**【中图分类号】** R733.71 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2014)05-0639-03

**Expression significance of BAALC in acute myeloid leukemia.** DONG Xiao-lin, ZHANG Shao-jun, QIU Gui-hua, LIAO Xue-mei, YANG Jie. Physical Examination Center, People's Hospital Affiliated to Hubei Medicine College, Shiyan 442000, Hubei, CHINA

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression and its significance of brain and acute leukemia cytoplasmic (BAALC) in acute myeloid leukemia (AML). **Methods** BAALC level was assessed by Western blot in the bone marrow mononuclear cells (BM-MNCs) of 58 AML patients, including 24 newly diagnosed patients, 28 complete remission patients and 6 relapsing patients, 15 nonmalignant hematopathy patients as negative controls and AML cell line KG1 $\alpha$  and HL-60 as positive controls. **Results** The expression of BAALC was positive in KG1 $\alpha$  and HL-60 cells but negative in 15 negative controls. The BAALC positive rate in AML newly diagnosed group (83.3%) and relapsing group (100%) was higher than that in complete remission (CR) group (7.1%) and negative control group ( $P < 0.001$ ). BAALC relative amount in AML newly diagnosed group and relapse group was significantly higher than that in CR group and negative control group ( $P < 0.01$ ). The positive rate and relative amount of BAALC showed no statistically difference between CR group and negative controls. **Conclusion** BAALC is overexpressed in AML patients, suggesting that BAALC is associated with the development of AML.

**【Key words】** Acute myeloid leukemia; BAALC; Complete remission

脑和急性白血病胞质(Brain and acute leukemia cytoplasmic, BAALC)基因定位于人类染色体 8q22.3, 最初是在伴有 8 号染色体三体的 AML 中鉴定出来的<sup>[1]</sup>。正常情况下, BAALC 基因主要表达在神经组织(如:脑、脊髓)和神经外胚层来源组织(如肾上腺、甲状腺、脾脏)及造血前体细胞如 CD<sub>34</sub><sup>+</sup> 的早期造血细胞<sup>[2]</sup>, 编码的蛋白质在高等哺乳动物中的表达高度保守。近年来研究发现, BAALC mRNA 在急性髓系白血病高表达, 与 AML 患者的预后密切相关, 被认为是 AML 预后较差的指标之一<sup>[3-6]</sup>。目前, 尚未发现 BAALC 基因编码的蛋白与目前已知的蛋白有同源性, 且 BAALC 蛋白在 AML 中的表达研究较少, 功能

尚不明确。我们采用 Western blot 方法半定量检测了 AML 细胞系 KG1 $\alpha$  和 HL-60 以及 58 例 AML 患者骨髓单个核细胞(Bone marrow mononuclear cells, BM-MNCs)中的 BAALC 蛋白表达, 并收集了 AML 患者的临床资料, 追踪观察临床疗效, 并了解不同病情(初诊、完全缓解、复发) AML 患者 BAALC 的表达水平, 初步探讨其临床意义。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 病例来自 2010 年 3 月至 2012 年 8 月期间我院血液科住院或者门诊随访 AML 患者 58 例, 男性 33 例, 女性 25 例, 中位年龄 45 岁(21~69 岁)。AML 的诊断、完全缓解、复发标准按张之南主

编《血液病诊断及疗效标准》<sup>[7]</sup>,其中初诊 24 例( $M_0$  2 例, $M_2$  9 例, $M_3$  2 例, $M_5$  11 例),完全缓解(CR) 28 例( $M_2$  8 例, $M_3$  8 例, $M_5$  10 例)和复发 6 例( $M_0$  1 例, $M_2$  3 例, $M_5$  2 例)。初诊的 AML 患者接受诱导缓解治疗,包括 DA (柔红霉素+阿糖胞苷)、IA (去甲柔红霉素+阿糖胞苷)、NV (米托蒽醌+卫萌)等化疗方案, $M_3$  首选全反式维甲酸+DA。获得 CR 的患者随后给予巩固治疗、维持治疗或进行造血干细胞移植。非恶性血液病患者 15 例作为阴性对照,其中巨幼细胞性贫血 3 例,缺铁性贫血(IDA) 6 例,特发性血小板减少性紫癜(ITP) 6 例。

## 1.2 方法

1.2.1 主要试剂 人淋巴细胞分离液(Ficoll,北京西美杰科技有限公司),PIPA I 型全蛋白抽提试剂盒(美国 DBI Bioscience),BCA 蛋白含量检测试剂盒(南京凯基生物科技有限公司),兔抗人 BAALC 多克隆抗体(美国 Abcam), $\beta$ -actin 抗体和二抗(HRP 标记羊抗兔 IgG)(美国 Santa Cruz),PVDF 蛋白印记膜(美国 Millipore),ECL 化学发光试剂盒(美国 Pierce)。

1.2.2 AML 细胞系与细胞培养  $KG1\alpha$  细胞和 HL-60 细胞购自中科院上海细胞库。HL-60 细胞和  $KG1\alpha$  细胞分别接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置于 37℃、5%  $CO_2$  饱和湿度培养箱中培养,2~3 d 传代,取处于对数生长期的细胞进行实验,作为本研究的阳性对照组。

1.2.3 标本采集及单个核细胞分离 抽取骨髓液 2~5 ml,用肝素抗凝,以磷酸盐缓冲液(PBS)稀释后加入人淋巴细胞分离液(Ficoll)上,离心 20 min,分离得到单个核细胞,PBS 洗涤两次,细胞沉淀于 -80℃ 冻存备用。

1.2.4 Western blot 检测 按照 RIPA 全蛋白抽提试剂盒的说明提取细胞总蛋白,用 BCA 蛋白含量检测试剂盒进行蛋白定量。以每孔 40  $\mu$ g 上样,经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转至 PVDF 膜上,5% BSA 室温封闭 1 h。BAALC 抗体(1:1 200) 4℃ 孵育过夜,以  $\beta$ -actin 抗体(1:2 000)为内参照,二抗 IgG-HRP (1:4 000)室温孵育 1 h,TBST 振荡洗涤,加入 ECL 发光液显色曝光。实验重复 3 次。用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析 BAALC 与  $\beta$ -actin 的灰度比值代表 BAALC 蛋白的相对含量。

1.3 统计学方法 应用 SPSS16.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用单因素方差分析,组间均数的比较采用 LSD 检验,率的比较采用 Pearson Chi-Square ( $\chi^2$ )检验,以  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 BAALC 蛋白在非恶性血液病对照者和 AML 细胞系中的表达 15 例非恶性血液病对照者 BAALC 蛋白 BAALC 相对含量为(0.041 $\pm$ 0.032),均为阴性。在  $KG1\alpha$  和 HL-60 白血病细胞株中 BAALC 均为高表达,BAALC 相对半定量值(BAALC/ $\beta$ -actin 灰度比)分别为(3.247 $\pm$ 0.640)和(1.842 $\pm$ 0.385) ( $n=3$ ,图 1A)。根据阳性对照组、阴性对照组以及实验组中 BAALC 蛋白表达水平,该实验中选定 BAALC/ $\beta$ -actin 灰度比值  $\geq 0.1$  为高表达, $<0.1$  为低表达,以此计算 BAALC 表达的阳性率。

2.2 AML 患者 BAALC 蛋白的表达 AML 患者 BAALC 蛋白表达阳性率在初诊组(83.3%)和复发组(100%)均高于 CR 组(7.1%)和阴性对照组(0) ( $P<0.001$ ),CR 组和阴性对照组差异无统计学意义( $\chi^2$ 值=0.09, $P=0.764$ )。采用 Pearson Chi-Square ( $\chi^2$ )检验比较不同组间 BAALC 蛋白的表达水平,CR 组与阴性组比较,差异无统计学意义( $P=0.122$ ),而初诊组和复发组 BAALC 蛋白明显低于 CR 组和阴性对照组( $P<0.05$ )。有 3 例 AML 患者在疾病的不同时期检测出 BAALC 的高表达:1 例  $M_3$  患者 BAALC/ $\beta$ -actin 初诊时为 1.353,CR 时为 3.329,且随访该患者 CR 后 4 个月复发;1 例  $M_2a$  患者初诊时为 2.629,经化疗达完全缓解后,BAALC 表达量将至 0.173;另 1 例  $M_2$  患者 CR 时为 0.087,复发时为 1.376 (图 1B)。

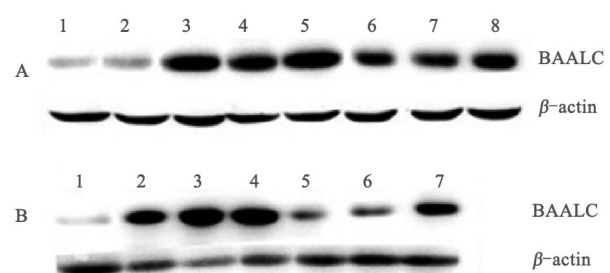


图 1 BAALC 在 AML 患者和细胞系中的表达情况

注:A:1、2,阴性对照组;3、4、5, $KG1\alpha$  细胞;6、7、8,HL-60 细胞。B:1,阴性对照组;2、3: $M_5$  初诊和复发;4、5: $M_2a$  初诊和缓解;6、7: $M_2$ CR 和复发。

## 3 讨论

白血病的发生和发展与多种相关致癌基因过表达或(和)抑癌基因失活有关,其中某些基因的异常表达起关键作用。BAALC 基因是近年来研究发现的与 AML 的发生和预后有密切关联的重要基因之一。BAALC 基因最初发现在神经外胚层来源的组织中表达,随后研究发现来自骨髓的  $CD34^+$  祖细胞也表达 BAALC mRNA,在骨髓祖细胞分化过程中,BAALC

的表达水平不断下调<sup>[8-9]</sup>,而且 BAALC 基因主要表达于这两种组织和细胞。Tanner 等<sup>[1]</sup>研究发现 AML、ALL 及 CML 急变期患者可检测到 BAALC 基因的高表达,而 CML 慢性期患者及 CLL 患者则检测不到。国内研究者采用实时荧光定量 PCR 技术检测到正常成人骨髓中也存在 BAALC mRNA 的低表达<sup>[10]</sup>。研究表明,BAALC mRNA 在新诊断的正常核型 AML 高表达,与完全缓解失败、原发性耐药和明显短的总生存和高的复发率有关<sup>[11-12]</sup>,被认为是 AML 患者的预后不良指标。也有研究报道在成人前体 B 细胞 ALL 患者中,BAALC 基因过表达的患者也具有较差的总生存率<sup>[13-14]</sup>。前述研究主要集中于研究 BAALC 基因 mRNA 表达水平与 AML 的预后关系,而 BAALC 蛋白在 AML 发生发展过程中所起的作用尚不清楚。

我们用 Western blot 方法检测了 BAALC 蛋白在 KG1 $\alpha$  和 HL-60 白血病细胞系、AML 患者以及非恶性血液病患者对照 BM-MNCs 中的表达。结果表明,BAALC 蛋白在 KG1 $\alpha$  和 HL-60 细胞均呈高表达,在非恶性血液病对照组表达极低甚至不能测出,而在 AML 患者初诊、完全缓解和复发不同病情时表达程度差异较大,初诊和复发患者 BAALC 蛋白明显高于完全缓解患者和非恶性血液病患者,且完全缓解和非恶性血液病患者之间表达差异无统计学意义。本研究中发现,1 例 AML 患者 BAALC 在初诊时 BAALC 表达已有升高,复发时 BAALC 表达进一步升高;另 1 例 AML 患者初诊时 BAALC 表达升高,经治疗达 CR 后 BAALC 表达下降。

BAALC 蛋白的功能研究报道较少。有研究者成功构建 BAALC 基因的表达载体分别转染人 HL60/ADM、MOLT-4 和 K562 细胞株筛选得到稳定过表达该基因细胞系,发现 BAALC 基因能促进 HL60/ADM 细胞株的增殖、抑制凋亡及增加 HL60/ADM 细胞株拮抗 As203 诱导凋亡的能力<sup>[15]</sup>。BAALC 基因沉默后能抑制 KG1 $\alpha$  细胞的增殖和诱导细胞凋亡<sup>[16]</sup>。表明 BAALC 基因可能在 AML 的发生发展过程中起促进作用。

综上所述,BAALC 在 AML 的发生、进展及演变过程中可能发挥了重要作用,从而有可能成为 AML 治疗的新靶点。

#### 参考文献

[1] Tanner SM, Austin JL, Leone G, et al. BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(3): 13901-13906.

- [2] Baldus CD, Tanner SM, Kusewitt DF, et al. BAALC, a novel marker of human hematopoietic progenitor cells [J]. Exp Hematol, 2003, 31(11): 1051-1056.
- [3] Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, et al. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study [J]. Blood, 2003, 102(5): 1613-1618.
- [4] Bienz M, Ludwig M, Leibundgut EO, et al. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(4): 1416-1424.
- [5] Baldus CD, Thiede C, Soucek S, et al. BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(5): 790-797.
- [6] Haferlach C, Kern W, Schindela S, et al. Gene expression of BAALC, CDKN1B, ERG, and MN1 adds independent prognostic information to cytogenetics and molecular mutations in adult acute myeloid leukemia [J]. Genes, Chromosomes Cancer, 2012, 51(3): 257-265.
- [7] 张之南, 沈 悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007: 103-134.
- [8] Baldus CD, Komor M, Hoelzer D, et al. Significant down-Regulation of BAALC during lineage specific hematopoietic differentiation [J]. Blood, 2004, 104(11): 133.
- [9] Mrozek K, Bloomfield CD. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia [J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2006, 2(8): 169-177.
- [10] 李红艺, 魏旭东, 吕晓东. 实时荧光定量 PCR 检测 BMLC 基因在正常核型急性髓系白血病中的表达[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(12): 1706-1709.
- [11] Santamaria C, Chillon MC, Garcia-Sanz R, et al. BAALC is an important predictor of refractoriness to chemotherapy and poor survival in intermediate-risk acute myeloid leukemia (AML) [J]. Ann Hematol, 2010, 89(5): 453-458.
- [12] 徐 兵, 宋小燕, 唐家宏, 等. 荧光定量 PCR 检测急性髓细胞白血病患者 BAALC 基因及临床意义[J]. 中国检验医学杂志, 2007, 30(10): 1123-1126.
- [13] Kuhl A, Gokbuget N, Stroux A, et al. High BAALC expression predicts chemoresistance in adult B-precursor acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood, 2010, 115(18): 3737-3744.
- [14] Baldus CD, Martus P, Burmeister T, et al. Low ERG and BAALC expression identifies a new subgroup of adult acute T-lymphoblastic leukemia with a highly favorable outcome [J]. J Clin Oncol, 2007, 25(24): 3739-3745.
- [15] 萧平难, 宋晓燕, 徐 兵, 等. 稳定过表达 BAALC 基因人白血病细胞株建立及生物学活性研究 [J]. 广东医学, 2011, 38(14): 1441-1449.
- [16] Xu B, Chen G, Shi P, et al. shRNA-mediated BAALC knockdown affects proliferation and apoptosis in human acute myeloid leukemia cells [J]. Hematology, 2012, 17(1): 35-40.

(收稿日期: 2013-05-28)