

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.06.012

· 临床研究 ·

## RUNX1 异构体在急性白血病中的表达及临床意义

杨志刚<sup>1,2</sup>, 刘佳<sup>2</sup>, 文瑞婷<sup>2</sup>, 吴国才<sup>2</sup>, 王巍<sup>3</sup>, 张宇明<sup>2</sup> (1. 广东医科大学附属湛江中心人民医院 血液风湿内科, 广东 湛江 524045; 2. 广东医科大学, 广东 湛江 524023; 3. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院 血液实验室, 上海 200437)

**[摘要]** **目的:**探讨 RUNX1 异构体的表达与临床疗效、疾病预后的关系, 以期为急性白血病的个体化治疗、预后判断及微小残留病(minimal residual disease, MRD)的监测提供有价值的实验依据。 **方法:**选择 2012 年 4 月至 2013 年 4 月于广东医学院(现为广东医科大学)附属医院血液内科住院的急性白血病初治患者 88 例、复发患者 10 例为研究对象。采用 qPCR 法检测急性白血病初治、复发患者以及对照组患者(非恶性白血病)RUNX1 异构体 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 的表达水平, 并追踪检测同一患者化疗前后 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 表达水平的变化。 **结果:** (1)AML 初治组、复发组以及 ALL 初治组 *RUNX1a* mRNA 的表达水平较对照组升高 ( $P < 0.05$ ), AML 初治组 *RUNX1a* mRNA 的表达水平较 ALL 初治组升高 ( $P < 0.05$ )。 (2)AML 及 ALL 患者初治时 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 的表达水平较化疗后完全缓解(complete remission, CR)时升高 ( $P < 0.05$ )。 (3)比较初诊时的 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 表达水平, 半年内死亡与存活患者、首疗程化疗后 CR 组与 NCR 组、初诊时高白细胞组与非高白细胞组均无显著差异 ( $P > 0.05$ ); *AML-ETO* 融合基因阳性患者 *RUNX1a* 表达水平较阴性患者升高 ( $P < 0.05$ )。 (4)急性白血病患者 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 的表达水平随着化疗呈递减趋势, 复发时又明显增高甚至超过初治状态。 **结论:** RUNX1a 异构体参与了急性白血病的发病, 并且与 AML 的复发相关; *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 表达水平与临床疗效相关, 与疾病预后无关, 可作为疾病疗效判断的指标; 动态监测 RUNX1a 和 RUNX1b/c 异构体的表达水平可以作为化疗后 MRD 监测的有效指标, 用于评估疗效、早期识别复发风险。

**[关键词]** RUNX1 异构体; 急性白血病; 疗效评估; 复发; 微小残留病

**[中图分类号]** R733.71; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)06-0620-09

## Expression of RUNX1 isoforms and its clinical significance in acute leukemia

YANG Zhigang<sup>1,2</sup>, LIU Jia<sup>2</sup>, WEN Ruiting<sup>2</sup>, WU Guocai<sup>2</sup>, WANG Wei<sup>3</sup>, ZHANG Yuming<sup>2</sup> (1. Department of Hematology and Rheumatology, Affiliated Zhanjiang Central People's Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524045, Guangdong, China; 2. Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, Guangdong, China; 3. Laboratory of Hematology, Yueyang Hospital of Integrative Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the relationship between the expression of RUNX1 isoforms and the clinical curative effect and the prognosis of acute leukemia (AL), in order to provide valuable experimental data for the individualized treatment, MRD (minimal residual disease) monitoring and prognosis prediction of AL. **Methods:** AL patients with primary treatment (PT,  $n=88$ ) and recrudescence (RC,  $n=10$ ) that treated at the Department of Hematology of Affiliated Hospital of Guangdong Medical University from April, 2012 to April, 2013 were included in this study. Real-time PCR was used to examine the mRNA expression of RUNX1 isoforms (*RUNX1a* and *RUNX1b/c*) in PT patients, RC patients and controls (non-malignant hematological disease patients). The changes in mRNA expression of *RUNX1a* and *RUNX1b/c* in patients before and after the chemotherapy were also observed. **Results:** (1)The expression levels of *RUNX1a* mRNA in AML and ALL PT group and AML RC group was significantly higher than those of control group ( $P < 0.05$ ); The expression level of *RUNX1a* mRNA in AML PT group was increased compared with ALL PT group ( $P < 0.05$ ). (2) The expression levels of *RUNX1a* and *RUNX1b/c* mRNA in AML and ALL patients at initial treatment were significantly higher than those after complete remission (CR) ( $P < 0.05$ ). (3) By comparing the expression levels of *RUNX1a* and *RUNX1b/c* mRNA at initial diagnosis,

**[基金项目]** 广东省科技计划基金资助项目 (No. 2014A020212300, 2016A020215149); 湛江市财政资金科技专项竞争性分配项目 (No. 2016A06003)。Project supported by the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (No. 2014A020212300, 2016A020215149), and the Zhanjiang City Financial Resources for Competitive Science and Technology Distribution Program (No. 2016A06003)

**[作者简介]** 杨志刚 (1966-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事血液病免疫学机制的研究

**[通信作者]** 杨志刚 (YANG Zhigang, corresponding author), E-mail: yangzg@gdmu.edu.cn

there was no significant difference between 6-month death group and survival group, CR group and NCR (non-complete remission) group after first cycle of chemotherapy, or the high leukocyte group and non-high leukocyte group (all  $P>0.05$ ). The expression level of *RUNX1a* mRNA in AML-ETO positive group was higher than that of negative group ( $P<0.05$ ). (4) The expression levels of *RUNX1a* and *RUNX1b/c* mRNA in patients with acute leukemia decreased with the increasing chemotherapy cycle, and significantly increased when had a relapse, which may even succeed the initial level. **Conclusion:** *RUNX1a* isoforms participate in the pathogenesis of acute leukemia, and is related to the relapse of AML. The expression levels of *RUNX1a* and *RUNX1b/c* mRNA are related to the clinical efficacy that can be used as an indicator of curative effect, but have no significant correlation with the prognosis of the disease. Dynamic monitor of the expression levels of *RUNX1a* and *RUNX1b/c* isomers can be used as an effective indicator of MRD monitoring after chemotherapy, which can be used to evaluate the efficacy and identify the risk of recurrence at early stage.

**[Key words]** *RUNX1* isoforms; acute leukemia; evaluation of curative effect; relapse; minimal residual disease (MRD)

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(6): 620-628. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.06.012]

Runt 相关转录因子 (runt-related transcription-factor, RUNX) 家族是一类重要的发育调控因子, 在细胞增殖、分化、发育以及凋亡中起调控作用。RUNX 家族主要包括 RUNX1、RUNX2 和 RUNX3<sup>[1]</sup>。有研究<sup>[2-3]</sup>发现, RUNX 家族参与了多种肿瘤的发生, 如 RUNX1 在造血调控以及血液肿瘤的发生发展中起重要作用; RUNX2 作为骨细胞的特异性转录因子, 参与了骨骼发育与骨肉瘤的形成<sup>[4]</sup>; RUNX3 的失活可导致实体瘤的形成<sup>[5]</sup>。因此, 不同的 RUNX 具有不同的组织表达特异性和不同的生物学功能。在 t(8; 21) 阳性的急性髓细胞性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 患者基因序列中 RUNX1 被首次发现, 因此亦称为 AML1<sup>[6]</sup>。RUNX1 由于 mRNA 剪接不同, 可编码 RUNX1a、RUNX1b 和 RUNX1c 三种异构体。RUNX1a 缺乏 C 末端转录调节结构域, 但与 RUNX1b 含有相同的 N 端结构。RUNX1b 与 RUNX1c 含有相同的 C 端结构, 两者具有相似的功能, RUNX1a 能够竞争性抑制 RUNX1b 及 RUNX1c。有研究<sup>[7]</sup>发现, RUNX1a 过表达可以抑制由 G-CSF 诱导的骨髓髓系祖细胞的终末分化, RUNX1a 缺乏转录活性, 比 RUNX1b 具有更高的亲和力与靶基因结合, 因此促进了白血病的发病。RUNX1a 在急性白血病患者骨髓单个核细胞中的表达水平升高, 并通过动物实验证实 RUNX1a 过表达能够导致白血病的发生<sup>[8]</sup>。RUNX1a 异构体大量表达于人脐带血 CD34<sup>+</sup> 细胞群体, 小鼠骨髓祖细胞中 *RUNX1a* 过表达能够促进移植后植入<sup>[9]</sup>。RUNX1a 能够扩增造血干细胞, 而抑制 RUNX1a 的功能可以促进单核细胞和粒细胞的生成<sup>[10-12]</sup>。与此相反的是, *RUNX1b/c* 过表达促进了 p53 依赖性的衰老, 并且促进了造血细胞分化<sup>[13-14]</sup>。因此, 不同的 RUNX1 异构体的表达水平对正常或恶性血细胞生成产生的作用是不同的。目前, 国内外大多是关于 *RUNX1* 基因功能及其对靶基因的转录调控机制的研究, 但关于 RUNX1 转录因子异构体 RUNX1a、RUNX1b 以及 RUNX1c 表达水平与急性白

血病临床类型、疗效及预后关系的研究鲜有报道。因此本研究通过比较急性白血病初次治疗 (primary treatment, PT)、复发 (recrudescence, RC) 患者与对照组 RUNX1 异构体 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 的表达差异, 并追踪患者化疗前后 RUNX1 异构体的表达变化, 探讨 RUNX1 异构体的表达与临床疗效、疾病预后的关系, 以期为急性白血病的临床个体化治疗、预后判断及微小残留病 (minimal residual disease, MRD) 监测提供有价值的实验依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选择 2012 年 4 月至 2013 年 4 月于广东医学院 (现为广东医科大学) 附属医院血液内科住院的急性白血病初治患者 88 例、复发患者 10 例为研究对象, 诊断参照 2008 年 WHO 分类标准<sup>[15]</sup>。入组 AML PT 患者 52 例、RC 患者 5 例 (急性早幼粒细胞白血病即 M3 除外), ALL PT 患者 36 例、RC 患者 5 例。以 51 例非恶性血液病患者为对照组, 其中缺铁性贫血 26 例、巨幼细胞性贫血 6 例、特发性血小板减少性紫癜 19 例; 男性 30 例, 女性 21 例, 中位年龄 41 岁 (15~82 岁)。化疗方案: AML (M3 除外) 诱导缓解采用 DA [柔红霉素 + 阿糖胞苷 (Ara-C)] 方案, 巩固治疗采用大剂量 Ara-C; ALL 诱导缓解和巩固治疗采用 VDCLD (长春新碱 + 柔红霉素 + 环磷酰胺 + 门冬酰胺酶 + 地塞米松) 方案。本研究已获广东医科大学附属医院医学伦理委员会同意, 所有入组人员均签署知情同意书。

88 例 PT 患者随诊 1~13 个月, 比较同一患者初诊时以及首疗程化疗完全缓解 (complete remission, CR) 后的 RUNX1 异构体的表达水平, 可评估的患者 AML 16 例、ALL 17 例。根据疾病确诊半年内是否存活, 分为 AML 死亡组 (9 例) 与存活组 (15 例), ALL 死亡组 (9 例) 与存活组 (11 例); 根据首疗程化疗后是否达到 CR 状态分为 CR 组 (AML 16 例、ALL 17 例) 与未完全缓解 (non-complete remission, NCR) 组 (AML 9

例、ALL3例);根据初诊时外周血白细胞数(AML: WBC>100×10<sup>9</sup>/L 为高白细胞;B-ALL: WBC>30×10<sup>9</sup>/L, T-ALL: WBC>100×10<sup>9</sup>/L 为高白细胞)将88患者分为高白细胞组13例(AML 7例, ALL 6例),与非高白细胞组75例(AML 45例, ALL 30例)。52例AML患

者中31例初诊时采用荧光原位杂交技术检测了 *AML-ETO* 融合基因,根据 *AML-ETO* 融合基因检测结果将31例患者分为 *AML-ETO* 融合基因阳性组(4例)和阴性组(27例)。88例患者临床资料见表1。

表1 88例患者临床资料(n)  
Tab.1 Clinical data of 88 patients(n)

Clinical feature	AML(N=52)	ALL(N=36)
Leukemia classification	M <sub>0</sub> 2, M <sub>1</sub> 1, M <sub>2</sub> 14, M <sub>4</sub> 16, M <sub>5</sub> 15, M <sub>6</sub> 2, Unclassified 2	L <sub>1</sub> 3, L <sub>2</sub> 17 Unclassified 16
Sex	Male 27 Female 25	Male 21 Female 15
Age(t/a)	48(5-87)	23(5-76)
CR group and NCR group after the first course of chemotherapy	CR 16 PR 4 NR 5	CR 17 PR 1 NR 2
RC	5	5
Death group and survival group at 6 months	Death 9 Survival 15	Death 9 Survival 11
High leukocyte	7	6
Non high leukocyte	45	30
<i>AML-ETO</i> fusion gene	Positive group 4 Negative group 27	-

1.2 主要试剂

淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物公司, TRIzol、逆转录试剂盒、SYBR@Premix Ex TaqTMII 试剂盒购自 TaKaRa 公司,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.3 总 RNA 提取

抽取骨髓液 2~4 ml,加 EDTA 抗凝,淋巴细胞分离液分离单个核细胞,按 TaKaRa 公司 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA,用紫外分光光度仪检测浓度及纯度,其 D<sub>260</sub>/D<sub>280</sub> 比值为 1.8~2.0。

1.4 cDNA 合成

在冰上进行逆转录反应液的配置,逆转录体系 10 μl,包括总 RNA 3 μl、5×PrimeScript Buffer 2 μl、RNase-free 水 5 μl,37 °C 反应 15 min,85 °C 反应 5 s。反应产物-20 °C 保存。

1.5 PCR 扩增产物的可靠性检测

通过 PCR 产物熔解曲线分析判断产物的可靠性。以 cDNA 作为模板,加入 PCR 反应体系扩增 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* 基因片段及内参 *GAPDH*。总反应体系 10 μl:SYBR Premix Ex Taq™ II 5 μl, PCR Forward Primer(10 μmol/L) 0.2 μl, PCR Reverse Primer(10 μmol/L) 0.2 μl, 逆转录反应产物 1 μl, dH<sub>2</sub>O 3.6 μl。PCR 循环条件: 95 °C 30s ; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s,

40个循环。

1.6 q-PCR 检测 *RUNX1a*、*RUNX1b/c* mRNA 表达水平

根据 *RUNX1* mRNA 序列,Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>)软件在线设计 *RUNX 1a* 和 *RUNX 1b/c* 引物,并进行 BLAST 分析([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)),避免非特异性扩增;内参 *GAPDH* 引物采用通用引物。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。引物序列及扩增片段见表 2。qPCR 反应按 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒说明书进行。在冰上进行 qPCR 反应液配置:SYBR Premix Ex Taq™ II 5 μl,PCR Forward Primer(10 μmol/L) 0.2 μl, PCR Reverse Primer(10 μmol/L) 0.2 μl, 逆转录反应产物 1 μl, dH<sub>2</sub>O 3.6 μl, 总体系 10 μl。反应条件: 预变性 95 °C 30 s, 1 个循环; PCR 反应 95 °C 5 s, 20 °C 45 s, 60 °C 20 s, 20 °C, 30 s, 40 个循环。*RUNX1a*、*RUNX1b/c* mRNA 相对表达量均用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 值表示, ΔCT = CT<sub>目的基因</sub> - CT<sub>内参基因</sub>。

1.7 追踪急性白血病患者从初治到连续化疗 2 个疗程后 *RUNX1* 异构体表达变化的趋势

分别于初诊时、第一个疗程化疗后、第二个疗程化疗后 3 个时间点采集每位患者的骨髓样本,采用 qPCR 法检测 3 个时间点患者的 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 表达水平;连续追踪 13 例患者(AML 8 例、

ALL 5例)化疗2个疗程的 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA表达变化趋势。

1.8 统计学处理

应用SPSS 17.0统计软件分析。本资料属于计量资料且不服从正态分布,用中位数(*M*)描述;除同一

急性白血病患者化疗前后的比较采用配对设计的Wilcoxon符号秩和检验外,其余2组之间的比较均采用独立样本Mann-Whitney *U*秩和检验,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

表2 *RUNX1a*和*RUNX1b/c*引物序列及扩增片段  
Tab. 2 *RUNX1a* and *RUNX1b/c* primers and amplified fragments

Gene	Primer sequence	Amplified fragment length(bp)
<i>RUNX1a</i>	F 5'-AACCCCTCAGCCTCAGAGTCA-3'	191
	R 5'-CCACATTCTGCCTTCCTCAT-3'	
<i>RUNX1b/c</i>	F 5'-AACCCCTCAGCCTCAGAGTCA-3'	98
	R 5'-CAATGGATCCCAGGTATTGG-3'	
<i>GAPDH</i>	F 5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3'	212
	R 5'-TGAGCTTGACAAAGTGGTCG-3'	

2 结果

2.1 PCR扩增产物均一可靠

所提RNA经分光光度计检测,  $D_{260}/D_{280}$  值为1.8~2.0,纯度好,可用于qPCR检测。熔解曲线分析(图1)显示, *RUNX1a*、*RUNX1b/c* 和 *GAPDH* 基因PCR扩增产物熔解温度均一,熔解峰为锐利的单一峰,说明扩增产物均一,无非特异扩增及引物二聚体。

2.2 急性白血病PT、RC患者 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA表达水平

AML及ALL PT组的 *RUNX1a* mRNA表达水平均较对照组增高,AMLPT组的 *RUNX1a* mRNA表达水平较ALL PT组升高,AML RC组 *RUNX1a* mRNA表达水平明显高于对照组(均  $P < 0.05$ ); ALL RC组表达水平虽高于对照组,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )

(表3、4)。AML及ALL PT组、RC组与对照组比较、AMLPT组与ALLPT组比较, *RUNX1b/c* mRNA表达水平均无统计学意义( $P > 0.05$ )(表3、4)。

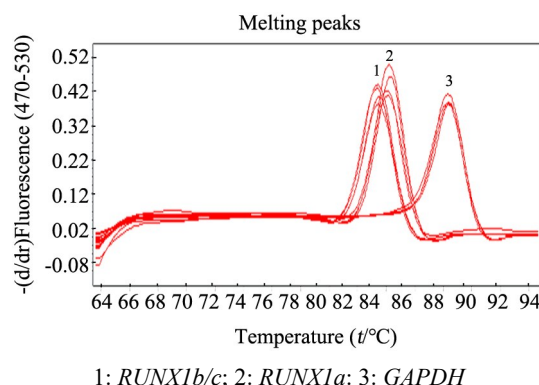


图1 *RUNX1b/c*、*RUNX1a*和*GAPDH*熔解曲线图  
Fig. 1 Fusion curves of *RUNX1b/c*, *RUNX1a* and *GAPDH*

表3 急性白血病PT、RC患者及对照组患者 *RUNX1a*、*RUNX1b/c* mRNA表达水平  
Tab.3 Expression levels of *RUNX1a* and *RUNX1b/c* mRNA in AL patients of PT, RC and controls

Group	<i>n</i>	<i>RUNX1a</i> mRNA			<i>RUNX1b/c</i> mRNA		
		<i>M</i>	<i>Z</i>	<i>P</i>	<i>M</i>	<i>Z</i>	<i>P</i>
Control	51	0.001193 (0.0000070-0.0290397)			0.0267403 (0.0026170-7.8154440)		
AML PT	52	0.0031500 (0.0000471-1.4401002)	-3.885	0.000	0.04322520 (0.0003680-25.8463530)	-1.867	0.062
RC	5	0.0190454 (0.0013168-52.7027373)	-2.715	0.007	0.0741320 (0.0054430-0.1417550)	-0.991	0.322
ALL PT	36	0.0015505 (0.0001398-4.8074390)	-6.524	0.000	0.0243370 (0.0000110-1.2118520)	-0.284	0.776
RC	5	0.0080501 (0.0000148-4.8317555)	-1.566	0.117	0.1431910 (0.0178860-2.1750790)	-1.911	0.060

2.3 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 的表达水平与急性白血病患者疗效的关系

采用配对设计的 Wilcoxon 符号秩和检验分析同一患者化疗前后 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 表达

的变化, 结果(表 5)显示, AML 及 ALL 患者初治时 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 的表达水平高于化疗 CR 后, 差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 4 AML 与 ALL PT 患者 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 表达水平  
Tab.4 Expression level of *RUNX1a* and *RUNX1b/c* mRNA in AML and ALL PT patients

Group	n	<i>RUNX1a</i> mRNA			<i>RUNX1b/c</i> mRNA		
		M	Z	P	M	Z	P
ALL PT	36	0.0015505 (0.0001398-4.8074390)	-2.003	0.045	0.0243370 (0.0000110-1.2118520)	-1.914	0.056
AML PT	52	0.0031500 (0.0000471-1.4401002)			0.0432252 (0.0003680-25.8463530)		

2.4 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 的表达水平与患者半年生存率的关系

比较半年内死亡组与存活组患者初诊时的 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 表达水平, 结果(表 6)显

示, AML 和 ALL 的死亡组与存活组比较, 患者初诊时的 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 的表达水平均差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 5 急性白血病 PT 和 CR 患者 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 的表达水平变化  
Tab. 5 Expression level of *RUNX1a* and *RUNX1b/c* mRNA in AL patients of PT and CR

Group	n	<i>RUNX1a</i> mRNA			<i>RUNX1b/c</i> mRNA			
		M	Z	P	M	Z	P	
AML	PT	16	0.0046180 (0.0001260-1.4401000)	1.877	0.002	0.0492840 (0.0050500-25.8463253)	1.600	0.012
	CR	16	0.0020310 (0.0001160-0.5862180)			0.0157890 (0.0040060-15.3750050)		
ALL	PT	17	0.0020220 (0.0001400-4.8074400)	2.183	0.000	0.0297700 (0.0024430-1.0044340)	1.411	0.037
	CR	17	0.0008960(0.0001920-0.0248430)			0.0146680 (0.0000110-1.2118520)		

表 6 急性白血病半年内死亡组与存活组患者治疗前 *RUNX1a* 和 *RUNX1 b/c* mRNA 的表达水平  
Tab. 6 Pre-treatment level of *RUNX1a* and *RUNX1 b/c* mRNA of acute leukemia patients in the 6-month death group and survival group

Group	n	<i>RUNX1a</i> mRNA			<i>RUNX1b/c</i> mRNA			
		M	Z	P	M	Z	P	
AML	Death	9	0.0027140 (0.0005640-0.0088060)	-0.03	0.976	0.0249490 (0.0003680-0.5988120)	-0.865	0.387
	Survival	15	0.0027430 (0.0000470-1.4401000)			0.0384820 (0.0059300-25.8463530)		
ALL	Death	9	0.0017480 (0.0001800-0.0106870)	-1.064	0.287	0.0261000 (0.0054110-0.1988800)	-0.57	0.569
	Survival	11	0.0008000 (0.0001400-0.0066610)			0.0155170 (0.0000110-1.2118520)		

2.5 首疗程化疗后 CR 组与 NCR 组患者治疗前 *RUNX1* 异构体的表达水平

比较 AML-CR 与 NCR 组患者治疗前的 *RUNX1a*、*RUNX1b/c* mRNA 表达水平, 结果(表 7)显

示, CR 组与 NCR 组患者治疗前 *RUNX1a*、*RUNX1b/c* 的 mRNA 表达水平比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。由于 ALL 的 NCR 组患者例数较少, 不纳入本次比较分析。

2.6 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 的表达水平与急性白血病患者初诊时外周血白细胞计数的关系

比较 ALL 高白细胞组与非高白细胞组 *RUNX1a*、*RUNX1b/c* mRNA 表达水平,结果(表 8)显示,虽然高

白细胞组 *RUNX1* 两个异构体 *RUNX1a*、*RUNX1b/c* 的 mRNA 表达水平高于非高白细胞组,但两组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

表 7 AML 首疗程 CR 组与 NCR 组患者治疗前 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 的表达水平  
Tab.7 Pre-treatment level of *RUNX1a* and *RUNX1b/c* mRNA of AML patients with CR and NCR after the first course of chemotherapy

Group	n	<i>RUNX1a</i> mRNA			<i>RUNX1b/c</i> mRNA		
		M	Z	P	M	Z	P
CR	16	0.0046180 (0.0001260-1.4401000)	-1.302	0.193	0.0492830 (0.0050500-25.8463530)	-0.566	0.571
NCR	9	0.0013420 (0.0000470-0.0154030)			0.0358670 (0.0056090-0.5988120)		

2.7 *RUNX1* 的表达水平与 *AML-ETO* 融合基因的关系

比较 *AML-ETO* 融合基因阳性组与阴性组 *RUNX1a*、*RUNX1b/c* mRNA 表达水平,结果(表 9)显

示,*AML-ETO* 融合基因阳性组 *RUNX1a* mRNA 的表达水平较阴性组明显升高( $P<0.05$ ),而 *RUNX1b/c* mRNA 的表达水平在阳性组与阴性组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

表 8 高白细胞组与非高白血病组 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 的表达水平  
Tab.8 Expression level of *RUNX1a* and *RUNX1b/c* mRNA in high leukocyte group and non- high leukocyte group

Group	n	<i>RUNX1a</i> mRNA			<i>RUNX1b/c</i> mRNA		
		M	Z	P	M	Z	P
AML High leukocyte	7	0.0027430 (0.0019000-0.0544090)	-0.121	0.904	0.0373520 (0.0003680-2.4056250)	-0.362	0.717
Non-high leukocyte	45	0.0033050 (0.0000470-1.4401000)			0.0372330 (0.0050500-25.8463530)		
ALL High leukocyte	6	0.0062170 (0.0002980-0.0501030)	-0.313	0.189	0.0513520 (0.0118320-0.2018050)	-1.061	0.289
Non-high leukocyte	30	0.0010320 (0.0001400-4.8074400)			0.0210870 (0.0000110-1.2118520)		

表 9 *AML-ETO* 融合基因阳性组与阴性组 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 的表达水平  
Tab.9 Expression level of *RUNX1a* and *RUNX1b/c* mRNA in positive *AML-ETO* fusion gene group and negative group

Group	n	<i>RUNX1a</i> mRNA			<i>RUNX1b/c</i> mRNA		
		M	Z	P	M	Z	P
Positive	4	0.0161450 (0.0083900-0.0307600)	-2.121	0.034	0.0299480 (0.0075670-25.8463530)	-0.236	0.814
Negative	27	0.0032560 (0.0000470-1.4401000)			0.0392330 (0.0050500-3.1680470)		

2.8 同一急性白血病患者从初治到连续 2 个疗程化疗后 *RUNX1* 异构体的表达变化趋势

追踪监测 13 例急性白血病患者从初治到连续 2 个疗程化疗后 *RUNX1* 异构体的表达水平变化,结果(图 2)显示,病例 1(ALL 患者)与病例 2(AML-M<sub>4</sub> 患者)在第 1 个疗程后 PR 时 *RUNX1a* 的表达水平高于初治时,第 2 个疗程 CR 后明显下降;病例 1 第 1 个疗

程后 PR 时 *RUNX1b/c* 的表达水平虽有降低,但第 2 个疗程 CR 时其表达水平又升高并超过初治时;病例 3(AML-M<sub>2</sub> 患者)第 1 个疗程后 CR 时 *RUNX1b/c* 的表达水平明显高于初治时,第 2 个程 CR 时其表达水平又明显下降。病例 1~3 在化疗期间均出现感染,病例 1 和病例 2 未查明为何种病原体所致,但抗感染治疗有效,病例 3 为病毒感染(病毒性结膜炎)。除上述个

别现象外,其余患者2种异构体 *RUNX1a*、*RUNX1b/c* 的表达水平在初治时最高,随着连续2次化疗其表达水平呈递减趋势,复发时又明显增高甚至超过初治状态(病例13为ALL复发患者)(图2)。

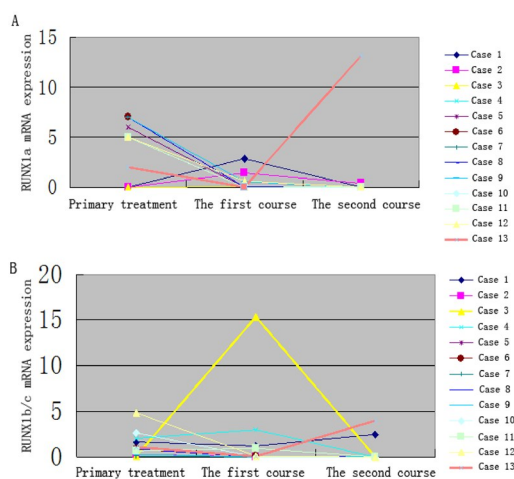


图2 急性白血病患者连续2个疗程化疗后 *RUNX1a*(A)和*RUNX1b/c*(B)的表达趋势

Fig. 2 Expression trend of *RUNX1a* (A) and *RUNX1b/c* (B) after chemotherapy for 2 consecutive courses in patients with acute leukemia

### 3 讨论

早期研究<sup>[16]</sup>认为, *RUNX1* 作为肿瘤抑制基因在AML中发挥抑癌作用,但是最近一些研究<sup>[17-18]</sup>发现, *RUNX1* 能够通过促进白血病细胞增殖发挥致癌作用。研究<sup>[10-12]</sup>报道, *RUNX1* 通过不同的异构体表达调节细胞的分化从而参与了恶性肿瘤的发生,不同的 *RUNX1* 异构体在白血病发病中的作用不同。本研究发现,AML和ALL初治患者 *RUNX1a* mRNA水平较非恶性血液病对照组升高, *RUNX1b/c* mRNA水平与对照组比较无明显差异。LIU等<sup>[8]</sup>研究也发现, *RUNX1a* 在AML-M2亚型和ALL中的表达水平高于健康对照组。这提示 *RUNX1a* 过表达促进了白血病的发生、发展,但是 *RUNX1b/c* 可能未直接参与白血病的发病。 *RUNX1a*、*RUNX1b/c* 异构体在白血病中的表达不同可能是由于 *RUNX1a* 过表达于CD34<sup>+</sup>细胞,并且促进了CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>造血干细胞的产生,但是 *RUNX1b/c* 缺乏这种功能<sup>[19-20]</sup>;也可能是由于 *RUNX1a* 缺乏维持正常的 *RUNX1* 功能所必需的C末端转录调节结构域,因此 *RUNX1a* 的过表达导致了异常的造血,但 *RUNX1* 异构体参与白血病发病的这些机制仍需进一步研究证实<sup>[8,21]</sup>。另外,本研究还发现,AML复发患者 *RUNX1a* mRNA水平较对照组升高,ALL复发患者 *RUNX1a* mRNA水平以及AML与ALL复发患者 *RUNX1b/c* mRNA水平较对照组亦有

升高,但无统计学差异。这可能与入组的复发患者病例数量太少有关,需要扩大病例数量进一步明确急性白血病复发与 *RUNX1a*、*RUNX1b/c* 的关系。

关于 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* 异构体与白血病疗效的关系目前未见报道,为了进一步探讨 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 的表达水平与急性白血病疗效的关系,本研究配对分析了同一急性白血病患者初治及首疗程化疗CR后的 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 表达水平变化,结果发现AML及ALL患者首疗程化疗后CR时 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 的表达水平较初治时明显降低。这提示 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 表达水平与急性白血病的临床疗效相关,可作为疾病疗效判断的指标。

*RUNX1* 突变可导致细胞遗传学正常的AML预后不良<sup>[22]</sup>。最近研究<sup>[23]</sup>也报道了 *RUNX1* 高表达是细胞遗传学正常的AML预后不良的标志,那么 *RUNX1* 异构体的表达水平是否与疾病的预后相关呢? 本研究通过分析急性白血病患者初诊时 *RUNX1* 异构体 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* 的表达水平与半年生存率、首疗程化疗后不同缓解状态、初诊时白细胞计数以及AML-ETO融合基因之间的关系,探讨了急性白血病患者 *RUNX1* 异构体 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* 的表达水平与疾病预后的相关性。结果发现急性白血病患者初诊时 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 的表达水平在死亡组与存活组之间的比较差异均无统计学意义,提示患者初诊时 *RUNX1* 异构体的表达水平与半年生存率无关,这与先前的报道AML患者初诊时 *RUNX1*-*RUNX1T1* 转录水平与无复发生存、总生存率均无明显相关基本一致<sup>[24]</sup>,但本研究中的患者随访时间较短,仍需要延长随访时间观察比较,以进一步明确 *RUNX1* 异构体的表达水平与生存率的相关性。本研究还分析了AML患者首疗程化疗后CR与NCR患者初诊时 *RUNX1a*、*RUNX1b/c* 的表达水平,结果发现CR与NCR患者初诊时 *RUNX1a*、*RUNX1b/c* 的表达水平无明显差异,提示患者初诊时 *RUNX1* 异构体的表达水平可能与预后无关。目前认为初诊时高白细胞计数是预后不良的因素,但本研究发现高白细胞组 *RUNX1a*、*RUNX1b/c* 的表达水平虽然较非高白细胞组有升高趋势,但差异不具有统计学意义,说明患者初诊时 *RUNX1* 异构体的表达水平与白细胞计数无相关性,也提示其表达水平可能与预后无关。单纯AML-ETO融合基因阳性被认为是AML预后良好的遗传学因素,本研究发现,AML-ETO融合基因阳性的AML患者 *RUNX1a* 表达水平较阴性患者升高,说明AML患者 *RUNX1a* 过表达与AML-ETO融合基因阳性有相关性,间接提示 *RUNX1a* 高表达可能

通过与 *AML1-ETO* 融合基因阳性相关参与 AML 发病,但与疾病预后无关。

白血病 MRD 监测对于评估疗效和早期发现高复发风险的患者至关重要,研究<sup>[25]</sup>发现,对 *AML-ETO* 融合基因阳性的患者造血干细胞移植前后进行基于 *RUNX1/RUNX1T1* 转录水平的 MRD 监测能够预测疾病复发风险。那么 *RUNX1* 的异构体 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* 是否可以作为监测化疗后 MRD 的有效指标,目前尚未见报道。本研究对 13 例急性白血病患者从初治到连续两个疗程化疗后 *RUNX1* 异构体的表达水平进行追踪检测,结果发现大多数患者 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* 表达水平随化疗疗程、疾病的缓解而下降,复发时又明显上升甚至超过初治时的表达水平。这可能是由于化疗药物直接杀伤清除白血病细胞减少了肿瘤细胞负荷从而降低 *RUNX1* 的表达量,这项结果与同一急性白血病患者初诊与 CR 时配对分析结果一致,均提示 *RUNX1* 异构体的表达水平与临床疗效相关,有望作为白血病 MRD 监测指标之一。对于本研究中存在少数患者在 PR、CR 时 *RUNX1* 异构体表达水平高于初治时的情况,追踪患者临床资料发现这些患者检测时均处于细菌或病毒感染活动期,随着感染因素去除,其表达水平亦随之下降。推测某些病原体感染可能会影响 *RUNX1* 表达水平,甚至可能通过 *RUNX1* 的过表达而导致白血病发生、发展。这一推测在最近报道<sup>[26-27]</sup>的动物实验研究中也初步得到证实,该研究发现病原体感染的存在可以诱导 *Sca1-ETV6-RUNX1* 小鼠发展为 B 细胞 ALL。因此,关于 *RUNX1* 与病原体感染的关系以及在白血病发病中的作用值得进一步研究。

综上所述,本研究发现 *RUNX1a* 异构体参与了急性白血病的发病,并且与 AML 的复发相关;*RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* mRNA 表达水平可能与急性白血病的预后无关,但与临床疗效相关,可作为疾病疗效判断的指标;动态监测 *RUNX1a* 和 *RUNX1b/c* 异构体的表达水平可以作为化疗后 MRD 监测的有效指标,用于评估疗效、早期识别复发风险。

#### [参考文献]

- [1] VOON D C, HOR YT, ITO Y. The RUNX complex: reaching beyond haematopoiesis into immunity[J]. *Immunology*, 2015, 146(4): 523-536. DOI: 10.1111/imm.12535.
- [2] ICHIKAWA M, YOSHIMI A, NAKAGAWA M, et al. A role for RUNX1 in hematopoiesis and myeloid leukemia[J]. *Int J Hematol*, 2013, 97(6):726-734. DOI: 10.1007/s12185-013-1347-3.
- [3] SOOD R, KAMIKUBO Y, LIU P. Role of RUNX1 in hematological malignancies[J]. *Blood*, 2017, 129(15):2070-2082. DOI: 10.1182/blood-2016-10-687830.
- [4] COHEN-SOLAL K A, BOREGOWDA R K, LASFAR A. RUNX2 and the PI3K /AKT axis reciprocal activation as a driving force for tumor progression[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14(3): 137-147. DOI: 10.1186/s12943-015-0404-3.
- [5] CHUANG L S, ITO Y. RUNX3 is multifunctional in carcinogenesis of multiple solid tumors[J]. *Oncogene*, 2010, 29(18): 2605-2615. DOI: 10.1038/onc.2010.88.
- [6] MIYOSHI H, SHIMIZU K, KOZU T, et al. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(116):10431-10434.
- [7] TANAKA T, TANAKA K, OGAWA S, et al. An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms[J]. *EMBO J*, 1995, 14(2): 341-350.
- [8] LIU X, ZHANG Q, ZHANG D E, et al. Over expression of an isoform of AML1 in acute leukemia and its potential role in leukemogenesis[J]. *Leukemia*, 2009, 23(4): 739-745. DOI: 10.1038 / leu.2008.350.
- [9] TSUZUKI S, HONG DL, GUPTA R, et al. Isoform-specific potentiation of stem and progenitor cell engraftment by AML1/RUNX1[J]. *PLoS One*, 2007, 4(14):880-896. DOI: 10.1371/journal.pmed.0040172.
- [10] TSUZUKI S, SETO M. Expansion of functionally defined mouse hematopoietic stem and progenitor cells by a short isoform of RUNX1 / AML1[J]. *Blood*, 2012, 119(3): 727-735. DOI: 10.1182 / blood-2011-06-362277.
- [11] RAN D, SHIA WJ, LO MC, et al. RUNX1a enhances hematopoietic lineage commitment from human embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells[J]. *Blood*, 2013, 121(15): 2882-2890. DOI: 10.1182/blood-2012-08-451641.
- [12] GUO H, MA O, SPECK N A, et al. Runx1 deletion or dominant inhibition reduces Cebpa transcription via conserved promoter and distal enhancer sites to favor monopoiesis over granulopoiesis[J]. *Blood*, 2012, 119(19): 4408-4418. DOI: 10.1182 / blood-2011-12-397091.
- [13] WOLYNIK K, WOTTON S, KILBEY A, et al. RUNX1 and its fusion oncoprotein derivative, RUNX1-ETO, induce senescence-like growth arrest independently of replicative stress[J]. *Oncogene*, 2009, 28(27): 2502-2512. DOI: 10.1038/onc.2009.2502.
- [14] WOTTON S F, BLYTH K, KILBEY A, et al. RUNX1 transformation of primary embryonic fibroblasts is revealed in the absence of p53[J]. *Oncogene*, 2004, 23(32): 5476-5486. DOI: 10.1038/onc.2004.5476.
- [15] VARDIMAN J W, THIELE J, ARBER D A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes[J]. *Blood*, 2009, 114(5):937-951. DOI: 10.1182/blood-2009-03-209262.
- [16] SILVA F P, MOROLLI B, STORLAZZI C T, et al. Identification of RUNX1 / AML1 as a classical tumor suppressor gene[J]. *Oncogene*, 2003, 22(4):538-547. DOI: 10.1038/sj.onc.1206141.
- [17] GOYAMA S, SCHIBLER J, CUNNINGHAM L, et al. Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(104): 3876-3888. DOI: 10.1172 / JCI68557.
- [18] GOYAMA S, HUANG G, KUROKAWA M, et al. Posttranslational modifications of RUNX1 as potential anticancer targets[J]. *Oncogene*, 2015, 34: 3483-3492. DOI: 10.1038/onc.2014.305



- [19] SAKURAI H, HARADA Y, OGATA Y, et al. Overexpression of RUNX1 short isoform has an important role in the development of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms[J]. *Blood Adv*, 2017, 1(18): 1382-1386. DOI: 10.1182/bloodadvances.2016002725.
- [20] REAL P J, NAVARRO-MONTERO O, RAMOS-MEJÍA V, et al. The role of RUNX1 isoforms in hematopoietic commitment of human pluripotent stem cells[J]. *Blood*, 2013, 121(26): 5250-5252. DOI: 10.1182/blood-2013-03-487587.
- [21] LAM K, ZHANG DE. RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis[J]. *Front Biosci*, 2012, 17(12): 1120-1139.
- [22] MENDLER J H, MAHARRY K, RADMACHER M D, et al. RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and with distinct gene and microRNA expression signatures[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(40): 3109-3118. DOI: 10.1200/JCO.2011.40.6652.
- [23] FU L, FU H, TIAN L, et al. High expression of RUNX1 is associated with poorer outcomes in cytogenetically normal acute myeloid leukemia[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13): 15828-15839. DOI: 10.18632/oncotarget.7489.
- [24] 高海涛, 张茵, 孙恺, 等. 动态监测 RUNX1-RUNX1T1 转录本水平在儿童急性髓系白血病中的预后价值[J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(3): 210-215. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.03.007.
- [25] WANG Y, WU D P, LIU Q F, et al. In adults with t(8;21)AML, post-transplant RUNX1/RUNX1T1-based MRD monitoring, rather than c-KIT mutations, allows further risk stratification[J]. *Blood*, 2014, 124(12): 1880-1886. DOI: 10.1182/blood-2014-03-563403.
- [26] 林斌, 徐双, 钱程. 低氧条件下 RUNX2 对小鼠乳腺癌 4T1 细胞凋亡的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(4): 373-379. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.007.
- [27] RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ G, HAUER J, MARTÍN-LORENZO A, et al. Infection exposure promotes ETV6-RUNX1 precursor B-cell leukemia via impaired H3K4 demethylases[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(16): 4365-4377. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0701.

[收稿日期] 2018-01-02

[修回日期] 2018-03-19

[本文编辑] 王映红