

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.29.004

## CDX2 基因在成人急性髓细胞白血病中的表达及临床意义\*

申淑珍,刘娟,马云,杨瑞,许飞,李玲,白晓川

(宁夏医科大学总医院血液科,银川 750004)

**[摘要]** **目的** 研究尾型同源盒基因 2(CDX2)在急性髓细胞白血病(AML)患者中的表达及临床意义。**方法** 通过 RT-PCR 方法检测 114 例初发 AML 患者及 56 例诱导化疗后患者骨髓和(或)外周静脉血单个核细胞 CDX2 基因表达,19 例随访患者每 3 个月定期检测 CDX2 基因表达。8 名健康者外周静脉血和 5 名缺铁性贫血患者骨髓作为对照。**结果** 114 例 AML 患者和 13 名对照的骨髓和(或)外周血单个核细胞均检测到 CDX2 基因表达。以第一个四分位数为界划分低表达组和高表达组,对照组 CDX2 基因表达水平均在低表达组,114 例 AML 患者高表达组 90 例(78.9%),对照组与 AML 患者 CDX2 基因表达差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。初发患者骨髓和外周静脉血 CDX2 基因表达呈正相关( $r = 0.656, P < 0.01$ )。CDX2 高低表达组诱导化疗完全缓解(CR)率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。本组 AML 病例 CDX2 高表达 78.9%。CR 患者 CDX2 表达量为化疗前的 10.3%~86.2%,且随着疗程增加逐步降低,复发时显著升高。随访 6 个月以上病例 19 例,两组早期复发率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** CDX2 表达量变化反映患者体内白血病细胞负荷,持续高表达可能是预后不良指标之一,可作为染色体核型正常 AML 微小残留病监测指标。

**[关键词]** CDX2;白血病,髓细胞,急性;预后;微小残留白血病

**[中图分类号]** R733.71

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)29-4042-03

### Expression and clinical significance of CDX2 gene in adult acute myeloid leukemia\*

Shen Shuzhen, Liu Juan, Ma Yun, Yang Rui, Xu Fei, Li Ling, Bai Xiaochuan

(Department of Hematology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the expression and clinical significance of caudal homeobox gene CDX2 in acute myeloid leukemia(AML) patients. **Methods** Bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) samples were collected in 114 cases of donor AML patients and 56 patients undergoing chemotherapy. The CDX2 gene expression in every patient's mononuclear cells were detected by RT-PCR. Among these patients, 19 cases were detected the gene continuous every three months. Eight healthy PB and five patients with iron deficiency anemia BM as control. **Results** CDX2 gene transcript levels were detectable in bone marrow mononuclear cells from 114 AML patients and 13 healthy donors, but the level of gene expression was higher in AML patients(90/114, 78.9%). There was a statistically significant difference between the AML patients and normal donor ( $P < 0.01$ ). The higher or lower expression of CDX2 gene showed no correlation with CR rate. CDX2 gene expression level had a positive correlation in BM and PB mononuclear cells (the correlation coefficient  $r = 0.656, P < 0.01$ ). The expression of CDX2 in patients with CR was 10.3%—86.2% of pre-chemotherapy, which decreased with the treatment course, while elevated in recurrence. 19 cases of patients underwent half a year of follow-up, there was no significant difference of the rate of early recurrence in two groups( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Higher expression level of CDX2 gene is mostly in AML patients, but its expression has no relation with CR rate. CDX2 gene may be a prognostic molecular marker in AML patients, and can be used to monitor the minimal residual disease of Normal chromosome karyotype AML.

**[Key words]** CDX2; leukemia, myeloid, acute; prognosis; minimal residual disease

尾型同源盒基因 2(CDX2)在急性髓细胞白血病(AML)中表达最早是 Chase 等<sup>[1]</sup>1999 年报道的,同时提示 CDX2 基因在白血病中的表达可能参与了白血病的发生。Scholl 等<sup>[2]</sup>研究提示成人白血病中存在胚胎通路的激活,CDX2 是同源盒基因(HOX)家族成员,是促进胚胎发育和早期造血发育的主控基因,通过胚胎通路的激活,导致成人急性白血病。在 AML 发病中起的是原癌基因的作用,CDX2 基因表达上调后通过增强造血祖细胞的自我更新能力而使细胞获得了潜在的致白血病性。本文通过检测初发及诱导化疗后 AML 患者骨髓及(或)外周静脉血中 CDX2 表达,19 例 AML(非急性早幼粒细胞白血病)随访超过 6 个月,每 3 个月检测骨髓和(或)外周静脉血单个核细胞 CDX2 基因表达。探讨其与 AML 患者临床

及预后、微小残留白血病(MRD)的关系。

#### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2011 年 8 月至 2014 年 8 月宁夏医科大学总医院血液科住院患者,经骨髓形态学及组织化学、免疫表型检查确诊初治 AML 患者 114 例,诊断及疗效标准依据张之南等<sup>[3]</sup>的《血液病诊断及疗效标准》。男 76 例,女 38 例,年龄 16~78 岁,就诊平均年龄 43.9 岁。完成常规标准方案(TA 或 IA)化疗 1 个周期可供疗效评估。对照为 8 名身体健康血液科工作人员外周静脉血和 5 名缺铁性贫血(IDA)患者骨髓。随访截止 2014 年 12 月。

**1.2 主要试剂和仪器** TRIzol、PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)和 Premix EX Taq(Perfect Real Time)(大

\* 基金项目:2012 年宁夏回族自治区科技攻关项目。 作者简介:申淑珍(1969—),硕士,主任医师,主要从事血液内科专业工作。

连 TaKaRa 生物工程公司),ABI7300 荧光定量 PCR 仪(ABI 公司)。

1.3 方法

1.3.1 引物设计和合成 基因序列从 GenBank 中获取,引物用 Primer5.0 软件进行设计。由上海闪晶生物技术有限公司合成。CDX2 基因上游引物 5'-TTC AGA ACC GCA GAG CAA AG-3',下游引物 5'-CCC AGG GAC AGA GCC AGA C-3';内参基因 GAPDH 上游引物 5'-CCA TGT TCG TCA TGG GTG TGA ACC A-3',下游引物 5'-GCC AGT AGA GGC AGG GAT GAT GTT C-3'。

1.3.2 单个核细胞提取 采集患者和对照者骨髓、静脉血,EDTA 抗凝,加入淋巴细胞分离液,按说明书分离并收集单个核细胞。

1.3.3 RNA 提取和 cDNA 合成 提取患者和对照骨髓及全血的单个核细胞用 Trizol 试剂,按说明书所附提取步骤提取 mRNA,用微量分光光度计(NanoDrop, Thermo)定量,OD<sub>260/280</sub> 比值在 1.8~2.0,于-80℃保存。按照逆转录试剂盒说明书进行反转录反应。总体系 20 μL:2×RTmix 液 10 μL,模板 RNA 100~500 ng,加 RNase free 水至总体积 20 μL;反应条件:37℃ 16 min,85℃ 5 s。

1.3.4 RT-PCR 所有基因 RT-PCR 按照试剂盒配制定量 PCR 反应体系。在 20 μL 反应体系中含 2×PCR Mix 10 μL,上、下游引物各 1 μL(2.5 μmol/L),Rox II 0.4 μL,cDNA 反应产物 2 μL,加入 RNasefree 水补足至 20 μL。在 ABI 7500 Fast 上进行定量反应,反应条件为 95℃ 30 s 变性,95℃ 30 s,60℃ 30 s,50 个循环。每个样本均设 3 个复孔,取平均值用于结果统计。

1.3.5 基因 mRNA 表达水平相对定量与分析 反应结束后,ABI7300 SDS Software 自动分析荧光信号并将其转换 Ct 值。Ct 值取 3 个复管的平均值。ΔCt 为目的基因 Ct 值与内参 Ct 值的差值。

1.3.6 CDX2 基因表达水平的计算方法 CDX2 基因表达量=2<sup>-ΔΔCt</sup>(ΔΔCt=ΔCt 患者-ΔCt 健康对照)×10<sup>7</sup>。

1.3.7 CDX2 基因表达四分位数划分 CDX2 基因表达量根据统计学中四分位数 Q1,Q2 和 Q3 结合健康人表达水平来划分高低表达组,低于 Q1 的为低表达组,>Q1 的为高表达组。

1.4 统计学处理 所有数据均经 SPSS11.5 软件进行统计分析,计数资料用率表示,用 χ<sup>2</sup> 检验或 Fisher 确切概率,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 t 检验,相关分析采用 Pearson 相关分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CDX2 基因表达情况 114 例 AML 患者血和骨髓及对照组骨髓或静脉血均检测到 CDX2 基因表达,114 例 AML 患者骨髓中位表达水平为 620.02(1.17~5 672 670.61),血中位表达水平为 647.33(3.22~8 213 486.54),骨髓和血 CDX2 基因表达具有正相关(r=0.656,P<0.01)。对照组 CDX2 基因 mRNA 表达水平相对定量与 AML CDX2 基因 mRNA 表达水平相对定量差异有统计学意义(P<0.01)。

2.2 CDX2 基因表达与临床特征相关性 114 例 AML 患者骨髓低表达组 24 例(表达范围 1.17~175.19),高表达组 90 例(175.19~5 672 670.61),占 AML 病例 78.9%。男性患者高表达 81.6%,女性患者高表达 73.7%,年龄大于或等于 60 岁组高表达 87.0%,<60 岁组高表达 76.9%,白细胞数大于或等于 30×10<sup>9</sup>/L 组高表达 85.0%,白细胞数小于 30×10<sup>9</sup>/L 组

高表达 75.7%,乳酸脱氢酶大于或等于 1 000 U/L 组高表达 82.2%,乳酸脱氢酶小于 1 000 U/L 组高表达 76.8%,免疫表型 CD34<sup>+</sup> 的病例组高表达 72.0%,CD34<sup>-</sup> 的病例组高表达 92.3%,CD7<sup>+</sup> 病例组高表达 83.0%,CD7<sup>-</sup> 病例组高表达 70.2%,差异均无统计学意义(P>0.05)。在 FAB 分型中高表达分别为 AML-M0 100%,AML-M1 89.3%,AML-M2 65.5%,AML-M3 25.0%,AML-M4 78.6%,AML-M5 84.6%,AML-M6 100%,淋髓混合病例高表达 100%,差异无统计学意义(P>0.05)。染色体正常核型组高表达 78.3%,预后良好核型组高表达 55.0%,预后不良核型组高表达 90.9%,其他核型组高表达 81.8%,差异无统计学意义(P>0.05),见表 1。

2.3 CDX2 表达与诱导缓解率的关系 114 例 AML 患者中有 56 例(非急性早幼粒细胞白血病)完成诱导化疗,骨髓细胞形态学完全缓解(CR)37 例,其中 CDX2 低表达 11 例(29.7%),CDX2 高表达 26 例(70.3%);骨髓细胞形态学未缓解(NR)19 例,其中 CDX2 低表达 3 例(15.8%),CDX2 高表达 16 例(84.2%),差异无统计学意义(P>0.05),见表 1。

表 1 AML 患者 CDX2 基因表达与临床特征、治疗反应相关性[n(%)]

| 临床特征                | n  | 低表达组<br>(n=24) | 高表达组<br>(n=90) | P     |
|---------------------|----|----------------|----------------|-------|
| 年龄(岁)               |    |                |                | 0.223 |
| ≥60                 | 23 | 3(13.0)        | 20(87.0)       |       |
| <60                 | 91 | 21(23.1)       | 70(76.9)       |       |
| 性别                  |    |                |                | 0.065 |
| 男                   | 76 | 14(18.4)       | 62(81.6)       |       |
| 女                   | 38 | 10(26.3)       | 28(73.7)       |       |
| WBC(个/L)            |    |                |                | 0.073 |
| ≥30×10 <sup>9</sup> | 40 | 6(15.0)        | 34(85.0)       |       |
| <30×10 <sup>9</sup> | 74 | 18(24.3)       | 56(75.7)       |       |
| LDH(U/L)            |    |                |                | 0.343 |
| ≥1 000              | 45 | 8(17.8)        | 37(82.2)       |       |
| <1 000              | 69 | 16(23.2)       | 53(76.8)       |       |
| FAB 分型              |    |                |                | 0.153 |
| M0                  | 2  | 0              | 2(100)         |       |
| M1                  | 28 | 3(10.7)        | 25(89.3)       |       |
| M2                  | 29 | 10(34.5)       | 19(65.5)       |       |
| M3                  | 8  | 6(75.0)        | 2(25.0)        |       |
| M4                  | 14 | 3(21.4)        | 11(78.6)       |       |
| M5                  | 26 | 4(15.4)        | 22(84.6)       |       |
| M6                  | 3  | 0              | 3(100)         |       |
| 髓淋混合                | 4  | 0              | 4(100)         |       |
| 免疫分型                |    |                |                | 0.322 |
| CD34 <sup>+</sup>   | 75 | 21(28.0)       | 54(72.0)       |       |
| CD34 <sup>-</sup>   | 39 | 3(7.7)         | 36(92.3)       |       |
| CD7 <sup>+</sup>    | 47 | 8(17.0)        | 39(83.0)       |       |
| CD7 <sup>-</sup>    | 67 | 16(23.8)       | 51(76.1)       |       |
| 染色体核型               |    |                |                | 0.075 |
| 正常核型                | 46 | 10(21.7)       | 36(78.3)       |       |
| 预后良好核型              | 20 | 9(45.0)        | 11(55.0)       |       |
| 预后不良核型              | 11 | 1(9.1)         | 10(90.9)       |       |

续表 1 AML 患者 CDX2 基因表达与临床特征、治疗反应相关性[n(%)]

| 临床特征 | n  | 低表达组     | 高表达组     | P     |
|------|----|----------|----------|-------|
|      |    | (n=24)   | (n=90)   |       |
| 其他核型 | 22 | 4(18.2)  | 18(81.8) | 0.190 |
| 治疗反应 |    |          |          |       |
| CR   | 37 | 11(29.7) | 26(70.3) |       |
| NR   | 19 | 3(15.8)  | 16(84.2) |       |

**2.4 诱导化疗前后 CDX2 表达变化** 37 例诱导化疗达 CR 病例 CDX2 表达较化疗前均有不同程度降低,化疗后 CDX2 表达量为化疗前的 10.3%~86.2%;19 例诱导化疗 NR 病例中,CDX2 表达量较化疗前有不程度升高 6 例,余 13 例 CDX2 表达较化疗前不同程度降低。

**2.5 随访病例治疗过程中 CDX2 表达变化** 随访 6 个月以上病例 19 例,其中 CDX2 高表达 15 例,诱导化疗 1 个疗程达 CR 12 例,诱导化疗 2 个疗程达 CR 3 例。CDX2 低表达 2 例诱导化疗 1 个疗程达 CR。CR 后 CDX2 表达量随化疗疗程次数增加逐步下降,复发时再次显著升高,且有 2 例随访超过 2 年复发病例,CDX2 升高早于 FCM 检测 MRD 及骨髓细胞形态学。持续不缓解 2 例,CDX2 表达量逐步升高,死亡前 CDX2 表达量分别是初发时的 60 倍及 100 余倍。

### 3 讨论

AML 是高度异质性的血液系统肿瘤,影响预后的因素包括临床特点、白血病类型、免疫学、遗传学、分子生物学及治疗反应、微小残留等。MRD 的检测对患者的再评估及危险度再分层至关重要<sup>[4]</sup>。监测 MRD 的方法主要有 PCR、流式细胞免疫分析(FCM)及 FISH。其中定量 PCR 通过检测白血病细胞中标志性基因实时观测 MRD,灵敏度可达  $10^{-6}$ ,且费用显著低于 FCM 及 FISH 的检测费用,但基因定量需要患者有特异性基因标记。约 60% 的 AML 患者有核型异常,预后良好的核型 t(15;17)形成的 PML/RAR $\alpha$  融合基因、t(8;21)形成的 AML1/ETO 融合基因、inv(16)、t(16;16)形成的 CBF $\beta$ /MYH11 融合基因,占成人 AML 患者 25%;而对于 t(8;21)合并 del(9q)、-Y 及复杂核型、MLLT4、MLLT10 等均提示预后不良;约 40% 的 AML 患者为正常核型,近些年新发现的与 AML 预后相关分子生物学指标如 FLT3、NPM1、CEBPA、IDH 等在正常核型 AML 患者中阳性率分别为 23%、50%、10%、15%<sup>[4]</sup>。新近研究发现,在大多数的急性白血病(AL)患者 CDX2 广泛高表达,CDX2 表达与 AL 患者白血病细胞负荷,MRD 成正相关<sup>[5]</sup>。

本文通过 RT-PCR 方法检测了初发成人 AML 患者(静脉血和骨髓)及健康者静脉血、IDA 患者骨髓 CDX2 基因 mRNA 表达水平,均有表达,但健康者及 IDA 患者表达水平均低,与 AML 患者的差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。本组 AML 病例 CDX2 基因高表达 78.9%。在以性别、年龄、FAB 分型、白细胞、乳酸脱氢酶分组的 CDX2 高表达、低表达之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),与陆滢等<sup>[6]</sup>研究相符。但 CDX2 基因在高白细胞数组高表达 85.0%,乳酸脱氢酶大于或等于 1 000 U/L 组高表达 82.2%,CD7<sup>+</sup> 病例高表达 83.0%;AML-M0 高表达 100.0%,AML-M5 高表达 84.6%,AML-M6 高表达 100.0%,

骨髓混合高表达 100%,预后不良核型组高表达 90.9%;而预后好的 AML-M3 高表达 25.0%,预后良好核型组高表达 55.0%。高白细胞、乳酸脱氢酶升高、FAB 分型 AML-M4、-M5、-M6、髓淋混合和染色体预后不良核型均是影响预后不良指标。随访持续不缓解 2 例患者,CDX2 表达逐步升高,死亡前 CDX2 表达量分别是初发时的 60 倍及 100 余倍。均提示 CDX2 高表达可能与白血病细胞高负荷和预后不良相关,还需更多的病例研究去证实。

本组病例统计显示 CDX2 高表达不影响 AML 诱导缓解率及早期复发率,这与黎国伟等<sup>[7]</sup>研究结果相符。化疗后 CR 患者 CDX2 表达量较化疗前均有不同程度降低,随访 6 个月以上病例 19 例,随着化疗疗程增加 CDX2 表达逐步降低,复发时显著升高。有 2 例随访超过 2 年复发病例,CDX2 基因表达量升高早于流式细胞仪(FCM)检测白血病微小残留及骨髓细胞形态学,且染色体正常核型组 CDX2 高表达 78.3%。提示可和 FCM 监测白血病相关免疫表型结合,作为染色体核型正常、无其他分子生物学异常标记 AML 患者的 MRD 监测。同时本组病例提示 AML 患者骨髓和外周静脉血均表达 CDX2 基因,且具有高度正相关,这与李迎侠等<sup>[8]</sup>研究结果相同,可用外周静脉血代替骨髓检测 CDX2 基因表达。但本研究连续观察病例数量少,CDX2 基因作为染色体核型正常 AML 患者 MRD 监测的临床意义,外周静脉血代替骨髓作为 MRD 监测的可靠性,还有待大宗病例的进一步观察。

### 参考文献

- [1] Chase A, Reiter A, Burci L, et al. Fusion of ETV6 to the caudal-related homeobox gene CDX2 in acute myeloid leukemia with the t(12;13)(p13;q12) [J]. Blood, 1999, 93(3):1025-1031.
- [2] Scholl C, Bansal D, Dhner K, et al. The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most cases of acute myeloid leukemia and promotes leukemogenesis [J]. J Clin Invest, 2007, 117(4):1037-1048.
- [3] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1991: P116-P121.
- [4] 潘登. 急性髓细胞白血病预后因素研究进展 [J]. 癌症进展, 2012, 10(4):360-363.
- [5] 李迎侠 CDX2 基因与白血病关系的研究进展 [J]. 国际儿科学杂志, 2011, 38(1):85-87.
- [6] 陆滢, 汪琼, 牧启田, 等. CDX2 基因在初发急性髓细胞白血病患者中的表达及临床意义 [J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(10):835-838.
- [7] 黎国伟, 王东宁, 叶玉蝶, 等. 急性髓细胞白血病 CDX2 基因表达及临床意义的探讨 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(16):1253-1255.
- [8] 李迎侠, 黄嘉莉, 钱新宏, 等. 儿童急性白血病 CDX2 基因 WT1 基因表达及其临床意义对照研究 [J]. 中国实用儿科杂志, 2013, 28(3):195-199.