

难治性急性淋巴细胞白血病患者治疗效果与地塞米松治疗敏感性的关系及耐药机制探讨

高晓艳¹, 田小清¹, 吕润林¹, 刘梅¹, 杨莉洁^{2*}

1. 榆林市第二医院 血液内科, 陕西 榆林 719000

2. 空军军医大学西京医院 血液内科, 陕西 西安 710032

摘要: **目的** 探讨难治性急性淋巴细胞白血病(ALL)患儿治疗效果与地塞米松治疗敏感性的关系及耐药机制。**方法** 回顾性分析榆林市第二医院自2015年1月—2017年7月治疗的105例难治性急性淋巴细胞白血病患者临床资料, 根据不同治疗敏感性分为敏感组与不敏感组。患儿均采取地塞米松治疗, 剂量为7.5~10 mg/(m²·d), 持续治疗7 d后, 给予标准化疗方案。比较两组化疗第26天骨髓象、危险度分级及地塞米松治疗前后的外周血白细胞糖皮质激素受体(GR)蛋白、GRα mRNA、Bcl-2蛋白家族促凋亡因子Bin蛋白、Bin mRNA表达水平; 随访6个月, 比较两组完全缓解率、复发率、死亡率。**结果** 在105例难治性ALL患儿中, 地塞米松治疗敏感69例、治疗不敏感36例。敏感组化疗第26天骨髓象分型、危险度分级均显著优于不敏感组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。敏感组地塞米松治疗后GR蛋白、GRα mRNA、Bin蛋白、Bin mRNA表达水平均显著高于不敏感组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。敏感组完全缓解率显著大于不敏感组, 复发率、死亡率均显著小于不敏感组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 难治性ALL患儿GR表达水平上调可增强地塞米松治疗敏感性, 放大地塞米松诱导细胞凋亡效应, 对于提高近期疗效具有一定作用, 值得进一步研究应用。

关键词: 地塞米松; 急性淋巴细胞白血病; 糖皮质激素受体; 近期疗效; 治疗敏感性

中图分类号: R969

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2019)09-1826-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.09.023

Relationship between therapeutic effect of refractory acute lymphoblastic leukemia and sensitivity of dexamethasone and the mechanism of drug resistance

GAO Xiaoyan¹, TIAN Xiaoqing¹, LÜ Runlin¹, LIU Mei¹, YANG Lijie²

1. Department of Hematology, Yulin NO.2 Hospital, Yulin 719000, China

2. Department of Hematology, Xijing Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the therapeutic effect of dexamethasone and the sensitivity of dexamethasone in children with refractory acute lymphoblastic leukemia (ALL) and the mechanism of drug resistance. **Methods** The clinical data of 105 children with refractory ALL treated in Yulin NO.2 Hospital from January 2015 to July 2017 were retrospectively analyzed, and divided into sensitive group and insensitive group according to the sensitivity of different treatments. All the children were treated with dexamethasone at a dose of 7.5 - 10 mg/(m² · d). After 7 days of continuous treatment, standardized treatment was given. Myelogram and risk grading on the 26th day of chemotherapy were compared between the two groups. And the glucocorticoid receptor (GR) protein, GRα mRNA, Bin protein, and Bin mRNA expression before and after dexamethasone treatment in peripheral blood were measured. After 6 months of follow-up, the complete remission rate, relapse rate, and mortality rate were compared between two groups. **Results** Among 105 children with refractory ALL, dexamethasone was sensitive to 69 patients and insensitive to 36 patients. On the 26th day after chemotherapy, the myelogram classification and risk grade of the sensitive group were significantly better than that of the insensitive group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The expression of GR protein, GRα mRNA, Bin protein and Bin mRNA in the sensitive group after treatment

收稿日期: 2019-01-24

第一作者: 高晓艳(1980—),女,陕西榆林人,本科,副主任医师,研究方向为血液内科。E-mail: Gaoxiaoyan198012@163.com

*通信作者: 杨莉洁(1973—),女,陕西洛川人,硕士,副主任医师,研究方向为白血病的治疗。E-mail: Gaoxiaoyan198012@163.com

with dexamethasone was significantly higher than that in the insensitive group ($P < 0.05$). The complete remission rate in the sensitive group was significantly greater than that in the insensitive group, and the recurrence rate and mortality were significantly less than those in the insensitive group, differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Up-regulation of GR expression in children with refractory ALL may increase the sensitivity of dexamethasone treatment, amplify dexamethasone-induced apoptosis, it has a role in improving the short-term curative effect, it is worth further research and application.

Key words: dexamethasone; acute lymphoblastic leukemia; GR; short-term efficacy; therapeutic sensitivity

近年来,急性淋巴细胞白血病(ALL)已成为儿童最常见的恶性肿瘤之一,临床多首选联合化疗方案治疗,地塞米松为联合化疗方案中的核心药物之一^[1]。ALL患儿的地塞米松治疗敏感性存在明显个体差异性,对于难治性ALL患儿而言,地塞米松治疗敏感性被认为是影响近期疗效、危险度及预后的关键因素。当前主流观点认为地塞米松治疗敏感性主要取决于糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)表达水平,若GR表达水平较低或结构功能缺陷,进而严重影响地塞米松诱导恶性淋巴细胞凋亡的效应^[2]。故研究难治性ALL患儿治疗效果与地塞米松治疗敏感性的关系及耐药机制,对于指导治疗,提高近期疗效,减少治疗失败和复发均具有一定作用。关于难治性ALL患儿治疗效果与地塞米松治疗敏感性的关系及耐药机制的研究报道较少,未形成专家共识。此外,关于GR调控基因表达谱的研究显示,Bcl-2蛋白家族促凋亡因子Bin可调控GR结构功能,激发地塞米松诱导细胞凋亡^[3]。对此,本研究通过观察不同地塞米松治疗敏感性难治性ALL患儿GR及Bin表达水平变化情况比较近期疗效,旨在探讨难治性ALL患儿治疗效果与地塞米松治疗敏感性的关系及耐药机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性分析榆林市第二医院自2015年1月—2017年7月治疗的105例难治性ALL患儿临床资料,均采用地塞米松治疗,根据不同治疗敏感性分为敏感组与不敏感组;敏感组69例,其中男41例、女28例;年龄2~14岁,平均 (4.83 ± 1.84) 岁;形态学分类:L1类17例、L2类37例、L3类15例;免疫分型:T系6例、B系63例。不敏感组36例,其中男21例、女15例;年龄1~15岁,平均 (4.91 ± 1.63) 岁;形态学分类:L1类9例、L2类19例、L3类8例;免疫分型:T系4例、B系32例。两组患儿性别、年龄、形态学分类、骨髓免疫分型比较差异均无统计学意义。敏感组初诊时外周血白细胞数的中位数为 $97.64 \times 10^9/L$,不敏感组为 $8.13 \times 10^9/L$,两组初诊时外周血白

细胞数比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

1.2 治疗方法

所有患儿均采用地塞米松治疗,口服醋酸地塞米松片(国药准字H41021038,遂成药业股份有限公司生产,规格0.75 mg/片,批号1410361、1507136、1645217),剂量 $7.5 \sim 10 \text{ mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ 。

治疗7 d后,给予标准化疗方案,诱导化疗为VLDL方案,药物组成:长春新碱(VCR)、柔红霉素(DNR)、左旋门冬酰胺(L-Asp)、地塞米松(DEX);早期强化化疗为CAM方案,药物组成:环磷酰胺(CTX)、阿糖胞苷(Ara-C)、6-巯基嘌呤(6-MP);根据不同危险度分组,给予不同强度的巩固化疗方案治疗,标危组和中危组的巩固化疗为大剂量甲氨蝶呤(HDMTX)、6-巯基嘌呤(6-MP);高危组的巩固化疗为甲氨蝶呤和(或)环磷酰胺-阿糖胞苷和(或)长春新碱-地塞米松(MTX/CA/VD)+6-MP。

1.3 检测方法

在地塞米松治疗前后1 d,采集所有患儿外周血2.0 mL,给予肝素抗凝处理,通过右旋糖酐沉降法分离白细胞,采用流式细胞术(FCM)检测外周血白细胞GR、Bcl-2蛋白家族促凋亡因子Bin表达水平,以平均荧光强度计算(鼠抗人GR单克隆抗体由上海一基实业有限公司供应,鼠抗人Bin单克隆抗体由上海谷研科技有限公司供应);采用荧光定量PCR检测GR α 、Bin mRNA表达水平,以熔解曲线分析;于地塞米松治疗第7天,进行骨髓穿刺涂片检查,若骨髓涂片中幼稚细胞比例 < 0.05 ,说明地塞米松治疗敏感;若骨髓涂片中幼稚细胞比例 ≥ 0.05 ,说明地塞米松治疗不敏感。

1.4 观察指标

比较两组化疗第26天的骨髓象、危险度分级及地塞米松治疗前后的外周血白细胞GR蛋白、GR α mRNA、Bcl-2蛋白家族促凋亡因子Bin蛋白、Bin mRNA表达水平;随访6个月,比较两组完全缓解率、复发率、死亡率。

1.5 危险度分级标准^[4]

根据化疗第26天的骨髓象进行分型,若原始淋

巴细胞+幼稚淋巴细胞比例<5%为M1型,5%~25%为M2型,>25%为M3型;结合地塞米松治疗敏感性进行危险度分级,若初诊为中枢神经系统白血病,或地塞米松治疗不敏感,或化疗第26天的骨髓象为M2/3,中危第8天为M3型,说明为高危;年龄≥6岁或确诊时外周血白细胞数的中位数 $\geq 20 \times 10^9/L$,或标危第8天为M3型,说明为中危;若不具备上述任何条件者,说明为标危。

1.6 数据处理

采用SPSS 18.0软件处理实验数据,符合正态分布且方差齐性的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较使用 t 检验;等级资料使用秩和检验;计数资料使用 χ^2 检验;检验水准为 $\alpha=0.05$,双侧检验。

2 结果

2.1 两组化疗第26天骨髓象分型、危险度分级比较

化疗第26天,敏感组骨髓象分型、危险度分级均显著优于不敏感组,两组比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见表1。

2.2 两组地塞米松治疗前后GR表达水平比较

地塞米松治疗前,两组GR蛋白、GR α mRNA表达水平无统计学差异;治疗后,敏感组GR蛋白、

表1 两组化疗第26天骨髓象分型、危险度分级比较

Table 1 Comparison on classification of myelogram and risk between two groups on 26th days after chemotherapy

组别	n/例	骨髓象分型/例			危险度分级/例		
		M1	M2	M3	标危	中危	高危
不敏感	36	10	12	14	1	2	33
敏感	69	67*	1*	1*	19*	41*	9*

与不敏感组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs insensitive group

GR α mRNA表达水平均较治疗前显著升高($P<0.05$);且显著高于不敏感,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。不敏感组地塞米松治疗后GR蛋白、GR α mRNA表达水平均较治疗前显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表2。

2.3 两组地塞米松治疗前后Bin表达水平比较

治疗前,两组Bin蛋白、Bin mRNA表达水平无统计学差异;敏感组地塞米松治疗后Bin蛋白、Bin mRNA表达较治疗前显著升高($P<0.05$);且显著高于不敏感组,差异有统计学意义($P<0.05$);不敏感组地塞米松治疗前后Bin蛋白、Bin mRNA表达水平比较,差异均无统计学意义,见表3。

表2 两组GR表达水平比较

Table 2 Comparison on GR expression levels between two groups

组别	n/例	GR蛋白表达水平(平均荧光强度)		GR α mRNA(Ig 拷贝数)	
		地塞米松治疗前	地塞米松治疗后	地塞米松治疗前	地塞米松治疗后
不敏感	36	90.62 $\pm$ 3.19	30.58 $\pm$ 2.16*	4.98 $\pm$ 0.15	2.02 $\pm$ 0.04*
敏感	69	91.54 $\pm$ 3.25	154.41 $\pm$ 3.84**	5.26 $\pm$ 0.12	12.25 $\pm$ 0.09**

与同组治疗前比较: * $P<0.05$; 与不敏感组地塞米松治疗后比较: ** $P<0.05$

* $P<0.05$ vs same group before treatment; ** $P<0.05$ vs insensitive group after treatment with dexamethasone

表3 两组地塞米松治疗前后Bin表达水平比较

Table 3 Comparison on Bin expression levels between two groups

组别	n/例	Bin蛋白表达水平(平均荧光强度)		Bin mRNA(Ig 拷贝数)	
		地塞米松治疗前	地塞米松治疗后	地塞米松治疗前	地塞米松治疗后
不敏感	36	142.25 $\pm$ 20.58	176.42 $\pm$ 14.25	3.01 $\pm$ 0.04	3.07 $\pm$ 0.06
敏感	69	153.62 $\pm$ 21.47	301.25 $\pm$ 28.91**	2.96 $\pm$ 0.05	6.61 $\pm$ 0.14**

与同组治疗前比较: * $P<0.05$; 与不敏感组地塞米松治疗后比较: ** $P<0.05$

* $P<0.05$ vs same group before treatment; ** $P<0.05$ vs insensitive group after treatment with dexamethasone

2.4 两组完全缓解率、复发率、死亡率比较

敏感组完全缓解率显著高于不敏感组,复发率、死亡率均显著低于不敏感组,两组比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见表4。

3 讨论

地塞米松在难治性ALL治疗中占有相当重要

的地位,归根于地塞米松可特异性地诱导恶性淋巴细胞凋亡,成为难治性ALL化疗方案的主要药物之一。GR被公认为影响地塞米松治疗敏感性的主要因素之一,地塞米松生物学效应必须通过与GR结合才能启动和介导,细胞内GR与伴侣蛋白,如热休克蛋白90等结合形成蛋白复合物,地塞米松与GR

表4 两组完全缓解率、复发率、死亡率比较

Table 4 Comparison on complete remission rate, recurrence rate and mortality rate between two groups

组别	n/例	完全缓解率/%	复发率/%	死亡率/%
不敏感	36	55.56	25.00	19.44
敏感	69	88.41*	8.70*	2.90*

与不敏感组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs insensitive group

结合后使伴侣蛋白脱离GR,形成地塞米松-GR复合物并进入核内,导致基因转录激活或抑制,从而调控细胞凋亡^[5-6]。笔者认同上述观点,并推测GR表达不足或结构功能缺陷,为研究地塞米松耐药机制提供新方向。既往研究难治性ALL地塞米松耐药机制,主要集中在GR表达水平上,认为地塞米松治疗敏感性与GR表达水平呈正相关。吴慧莲等^[7]发现地塞米松耐药组与地塞米松敏感组GR基础水平差异无统计学意义,据此提出GR基础水平对地塞米松治疗敏感性影响不明显。周越菡等^[8]研究报道难治性ALL患儿地塞米松治疗敏感性与GR表达水平呈正相关,未能分析GR基础水平对地塞米松治疗敏感性的影响。本研究表明,敏感组与不敏感组地塞米松治疗前GR蛋白、GR α mRNA表达水平比较,差异均无统计学意义;说明GR基础水平对地塞米松治疗敏感性的影响有待明确。除此之外,临床学者更倾向认为GR结构功能缺陷可作为影响地塞米松治疗敏感性的主要原因之一。

GR结构功能缺陷可导致亲和力下降、GR伴侣蛋白表达异常、地塞米松-GR复合位转位异常,从多方面调控地塞米松治疗敏感性。本研究从GR结构功能缺陷角度,根据不同的剪切点,将GR分为GR α 和GR β 两种亚型,其中GR β 不能与地塞米松结合,GR α 能与地塞米松特异性结合,产生经典的激素效应^[9]。许金云等^[10]在体外实验中发现,对地塞米松不敏感的恶性淋巴细胞GR α /GR β 比值呈减小趋势。Soh^[11]和王燕^[12]等均提出不同意见,一致认为难治性ALL患儿地塞米松治疗敏感性与GR β mRNA表达水平无关。对此,比较敏感组与不敏感组GR α mRNA表达水平具有一定依据。Souid等^[13]观察35例对地塞米松治疗敏感的难治性ALL患儿治疗情况,发现GR α mRNA表达水平明显上调。在本研究中,敏感组地塞米松治疗后GR蛋白、GR α mRNA表达水平均较治疗前显著升高($P < 0.05$),与不敏感组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);说明地塞米松诱导GR表达水平上调,增强治疗敏感性。同时,

不敏感组地塞米松治疗后GR蛋白、GR α mRNA表达水平均较治疗前显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示GR表达水平下调,可能作为地塞米松耐药的重要机制,受限于样本量较少和随访时间较短,有待日后深入研究。本研究观察了105例难治性ALL患儿在地塞米松治疗前后GR表达水平变化情况,发现敏感组GR表达水平上调,不敏感组GR表达水平下调,原因可能为地塞米松介导GR负反馈机制,促进GR自我诱导并上调GR基因转录和翻译水平,从而提高GR表达水平。Xiang等^[14]发现地塞米松作用白血病细胞株后GR表达水平明显上调,验证GR表达水平上调在增强地塞米松敏感中的作用较GR基础水平更大。因此,可以认为难治性ALL患儿GR表达水平上调可增强地塞米松治疗敏感性,提示GR缺乏自我诱导上调作为地塞米松耐药的重要原因。

本研究表明,敏感组化疗第26天骨髓象分型、危险度分级均显著优于不敏感组,两组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);说明难治性ALL患儿GR表达水平上调除增强地塞米松治疗敏感性外,还可能放大地塞米松诱导细胞凋亡效应,改善骨髓象分型、降低危险度分级。近年来,临床学者逐渐重视促凋亡因子Bin在调控细胞凋亡中的作用,有望从细胞因子层面上解释GR表达水平上调影响地塞米松治疗敏感性的机制。蔡骄阳等^[15]在恶性淋巴细胞株体外实验中发现,地塞米松诱导Bin高水平表达,在排除其他凋亡信号的基础上,验证了Bin具有激发地塞米松诱导细胞凋亡的作用。本研究表明,敏感组地塞米松治疗后Bin蛋白、Bin mRNA表达水平均较治疗前显著升高($P < 0.05$),与不敏感组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);不敏感组地塞米松治疗前后Bin蛋白、Bin mRNA表达水平比较,差异均无统计学意义。因此,本研究认为地塞米松诱导Bin水平上调,放大凋亡信号,介导GR对地塞米松治疗敏感性的调节,但目前研究仍未阐明地塞米松诱导Bin水平上调的途径。通过本研究可知,地塞米松主要通过GR才能启动细胞凋亡效应,GR自我诱导上调作为影响地塞米松治疗敏感性的主要原因,GR表达水平上调结合Bin可协同放大凋亡信号,增强地塞米松诱导细胞凋亡效应,进而解释敏感组化疗第26天骨髓象分型、危险度分级均显著优于不敏感组。此外,敏感组完全缓解率显著高于不敏感组,复发率、死亡率均显著低于不敏感组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),进一步提示GR表达

水平上调可增强地塞米松治疗敏感性,对于提高近期疗效具有一定作用,可能与放大地塞米松诱导细胞凋亡效应有关。

综上所述,难治性急性淋巴细胞白血病患者GR表达水平上调可增强地塞米松治疗敏感性,放大地塞米松诱导细胞凋亡效应,对于提高近期疗效具有一定作用,值得进一步研究应用;但本研究为回顾性研究,样本量较少,随访时间较短,有待日后采取前瞻性对照研究,增加样本量,延长随访时间,深入分析难治性难治性急性淋巴细胞白血病患者GR对于判断病情、指导治疗、改善预后的临床意义,为提高地塞米松治疗水平提供依据。

参考文献

- [1] 凌 纯, 陆美荣, 焦蓓蕾, 等. 儿童急性淋巴细胞白血病诱导化疗期合并脓毒症31例回顾分析 [J]. 广西医科大学学报, 2017, 34(5): 762-764.
- [2] 史红鱼, 郝国平, 王晓欢, 等. 糖皮质激素诱导试验在儿童急性淋巴细胞白血病早期预后评估中的应用 [J]. 白血病·淋巴瘤, 2015, 24(11): 676-678, 681.
- [3] Han J, Lin M, Zhou D F, et al. Huang qi Huai granules induce apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells through the akt/FoxO1 pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38(5): 1803-1814.
- [4] 胡英伟, 程诗宇, 谢彦晖. MicroRNA-182在判断淋巴细胞肿瘤患者糖皮质激素耐药中的应用 [J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(3): 781-785.
- [5] 沈 婷, 陈培松, 姜 悦. 雷帕霉素对急性淋巴细胞白血病细胞糖皮质激素反应性的影响 [J]. 热带医学杂志, 2017, 17(2): 152-155, 165.
- [6] Alford S E, Kothari A, Loeff F C, et al. BH3 inhibitor sensitivity and bcl-2 dependence in primary acute lymphoblastic leukemia cells [J]. Cancer Res, 2015, 75(7): 1366-1375.
- [7] 吴慧莲, 陈金妮. 肾上腺糖皮质激素联合乌司他丁治疗儿童川崎病患儿淋巴细胞亚群及预后的影响 [J]. 中国地方病防治杂志, 2017, 32(1): 109, 111.
- [8] 周越菡, 赵关关, 杜 敏, 等. 氯喹对地塞米松抑制急性淋巴细胞白血病细胞增殖的促进作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(6): 999-1003.
- [9] Li Y L, Buijs-Gladdines J G, Canté-Barrett K, et al. IL-7 receptor mutations and steroid resistance in pediatric T cell acute lymphoblastic leukemia: a genome sequencing study [J]. PLoS Med, 2016, 13(12): 1002200.
- [10] 许金云, 罗建明. BIM基因与儿童急性淋巴细胞白血病对糖皮质激素耐药的相关性 [J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(8): 945-949.
- [11] Soh S X, Lim J Y, Huang J W, et al. Multi-agent chemotherapy overcomes glucocorticoid resistance conferred by a BIM deletion polymorphism in pediatric acute lymphoblastic leukemia [J]. PLoS One, 2014, 9(8): 103435.
- [12] 王 燕, 韩正祥, 张敬川. 骨髓基质细胞对急性淋巴细胞白血病细胞化疗敏感性的影响 [J]. 中华肿瘤杂志, 2017, 39(12): 885-890.
- [13] Souid S, Najja H, Riahi-Chebbi I, et al. *Allium roseum* L. extract exerts potent suppressive activities on chronic myeloid leukemia K562 cell viability through the inhibition of BCR-ABL, PI3K/akt, and ERK1/2 pathways and the abrogation of VEGF secretion [J]. Nutr Cancer, 2017, 69(1): 117-130.
- [14] Xiang X, Foster P, Zhang X, et al. Systematical evaluation of candidate genetic marks for leukemia [J]. Med One, 2016, 1(4): 6.
- [15] 蔡娇阳, 薛惠良, 陈 静, 等. 儿童T系急性淋巴细胞白血病99例治疗分析 [J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(6): 456-460.