

急性髓系白血病 SIRT3 的表达

张妍 杨明珍

摘要 目的 观察急性髓系白血病(AML)患者化学治疗前后活性氧(ROS)、异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)、去乙酰化酶3(SIRT3)动态变化情况,探讨不同AML患者ROS、IDH2、SIRT3水平的差异及其在临床诊断和疗效评价中的应用价值。方法 取20例新诊断的且尚未行化学治疗的AML(非APL)患者骨髓及外周血标本(新诊断组);取40例已行化学治疗的AML(非APL)患者骨髓及外周血标本(经治组);取20例正常人骨髓及外周血标本作为对照(对照组)。荧光显微镜下观察各组骨髓单个核细胞及骨髓单个核细胞线粒体中ROS的表达,ELISA测定各组外周血中IDH2、SIRT3的表达。对患者AML1-ETO融合基因表达与否进行归纳总结,比较不同组中SIRT3的表达。比较经治患者中不同治疗疗效、治疗疗程中SIRT3的表达。结果 三组中骨髓单个核细胞内及细胞中线粒体ROS的表达,新诊断组高于对照组($P < 0.05$),经治组低于新诊断组($P < 0.05$)。三组的外周血IDH2的表达,新诊断组高于对照组($P < 0.0001$);经治组低于新诊断组($P < 0.05$)。外周血标本稀释5倍后,SIRT3的表达新诊断组低于对照组($P < 0.0001$);经治组高于新诊断组($P < 0.01$)。经治患者中融合基因阳性者SIRT3表达高于融合基因阴性者;部分缓解者SIRT3表达高于完全缓解者;经治患者中完全缓解亚组,治疗疗程长者SIRT3表达高于治疗疗程短者。结论 SIRT3是作为重要蛋白质在细胞线粒体中调节代谢功能,其在急性髓系白血病患者中表达下调,IDH2及ROS表达随之升高。在AML中,SIRT3的异常表达会加速肿瘤的发生发展及降低治疗疗效。

关键词 去乙酰化酶3;急性髓系白血病;活性氧;异柠檬酸脱氢酶2;线粒体

中图分类号 R 551.31

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)11-1826-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.025

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia,AML)是一种以造血干细胞异常生长和分化为特征的恶性疾病,具有增殖、存活和分化异常的特点^[1],据最新

统计,其死亡病例数占有恶性肿瘤死亡病例的3.1%^[2]。白血病常见的治疗方法主要有化学治疗、分子靶向治疗及造血干细胞移植等治疗手段。其死亡的主要原因仍然是化疗耐药导致的难治性或复发性疾病^[3]。活性氧(reactive oxygen species,ROS)是有氧呼吸的代谢副产物,维持细胞内氧化还原动态平衡。增高癌细胞ROS水平,会使其比正常细胞更易受到氧化应激诱导的细胞死亡^[4]。去乙酰化酶3(sirtuin 3,Sirt3)是主要位于线粒体中的去乙酰化酶,能够调节异柠檬酸脱氢酶2(isocitrate dehydrogenase 2,IDH2)、ROS的表达,可作为提高AML标准化疗药物疗效的潜在治疗靶点^[5]。基于此,该研究探讨AML患者SIRT3、IDH2与ROS的表达及其在临床诊断和疗效评价中的应用价值,期为临床治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集2020年10月—2021年12月安徽医科大学第一附属医院收治的新诊断的AML(非APL)患者20例作为新诊断组,其中男9例,女11例;18.00~86.00岁,中位年龄57.00岁。2例未进行融合基因AML1-ETO检测,16例检测阴性;2例患者融合基因AML1-ETO阳性。治疗后AML(非APL)患者40例作为经治组,其中男22例,女18例;18.00~65.00岁,中位年龄51.50岁。7例未进行融合基因AML1-ETO检测,25例检测阴性;8例患者融合基因AML1-ETO阳性。其中完全缓解者20例,部分缓解者20例。完全缓解者20例中,根据不同患者治疗疗程,以中位数6个疗程为界,其中少于等于6个治疗疗程11例,高于6个治疗疗程9例。均经骨髓细胞形态学、免疫学、细胞遗传学等检测后确诊为急性髓系白血病。20例正常人作为对照组。本研究经安徽医科大学第一附属医院医学伦理委员会审核通过(批号:PJ2021-16-14),以及取得患者知情同意。

1.1.1 对照组纳入标准 ①血常规、肝肾功能无异常,既往无肿瘤史、自身免疫性疾病病史;②排除合并其他肿瘤性、血液性、传染性、免疫性疾病。

2022-05-11 接收

基金项目:安徽省重点研究与开发计划项目(编号:202104j07020028)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院血液内科,合肥 230022

作者简介:张妍,女,硕士研究生;

杨明珍,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: yangmz89@163.com

1.2 主要实验材料及试剂 IDH2 ELISA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; SIRT3 ELISA 试剂盒购自武汉基因美公司; 酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司; 倒置荧光显微镜购自德国蔡司公司。FBS 胎牛血清、RPMI-1640 培养基、无水二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、Hank's 平衡盐溶液 (Hank's balanced salt Solution, HBSS)、杜氏磷酸缓冲液 (Dulbecco's phosphate-buffered saline, D-PBS)、2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酯 (DCFH-DA)、线粒体绿色荧光探针 (MITO-Tracker Green) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; 人淋巴细胞分离液购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 分离骨髓单个核细胞 常规骨髓穿刺, 抽取新诊断组、经治组患者及对照组骨髓液 3 ml, 加等量无菌 PBS 液用吸管反复吹打、充分混匀。加入等体积的分离液于无菌管中, 将稀释后的骨髓液缓慢平铺到分离液上方, 按照说明离心后小心吸取中间的白膜层, 加入 PBS 液, 用吸管反复吹打、混匀、离心, 去上清液后将细胞收集。

1.4 测量骨髓单个核细胞内 ROS 的表达 以 1 : 2 000 的比例用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 至终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 。收集细胞, 重悬于稀释的 DCFH-DA 中, 吹打均匀后置入细胞培养箱中避光孵育 20 min, 用无血清培养基重悬细胞进行洗涤, 以去除未进入细胞内的检测试剂。收集各组细胞于倒置荧光显微镜下观察, 实时监测各组平均荧光强度。并用 Image J 软件分析。

1.5 测量骨髓单个核细胞线粒体内 ROS 表达 Mito-Tracker Green 用无水 DMSO 配制至终浓度为 1 mmol/L, 作为储存液与 HBSS 按照比例配制成工作液。将各组已提取的骨髓单个核细胞加入适量 Mito-Tracker Green 工作液, 吹打均匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 离心取上清液, 无血清培养基重悬, 全程避光, 倒置荧光显微镜下观察, 监测各组平均荧光浓

度, 并用 Image J 软件分析。

1.6 ELISA 方法检测外周血血浆标本 IDH2、SIRT3 的表达 抽取新诊断组、经治组患者及对照组外周血 3 ml 置于含柠檬酸钠管中, 常温下 1 500 r/min 离心 10 min, 收集上清液; 按试剂盒说明测定外周血血浆 IDH2、SIRT3 的表达情况, 并在平板阅读器上于 450 nm 处立即测量吸光度。用二次多项式拟合曲线计算 IDH2、SIRT3 浓度。

1.7 观察指标及评价标准 分析比较 AML (非 APL) 各亚组患者实验室检查、治疗疗效及不同治疗疗程中 SIRT3 的表达。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 24.0 对所有实验数据进行统计学分析, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组组间差异运用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行组间的比较, 组间样本均数的两两比较用 LSD-*t*、Tamhane T2 检验。两组组间差异运用 *t* 检验进行比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。最后采用 GraphPad Prism 8.0 制图。

2 结果

2.1 ROS 在骨髓单个核细胞中的表达 相比较对照组, 新诊断组中 ROS 表达明显上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。相较于新诊断组, 经治组 ROS 表达明显下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 ROS 在骨髓单个核细胞线粒体中的表达 相比较对照组, 新诊断组 ROS 表达上调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。相较于新诊断组, 经治组 ROS 表达明显下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 各组间 SIRT3、IDH2 水平变化 相较于对照组, 新诊断组中 IDH2 的表达上调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.000 1$); 相较于新诊断组, 经治组中 IDH2 的表达下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);

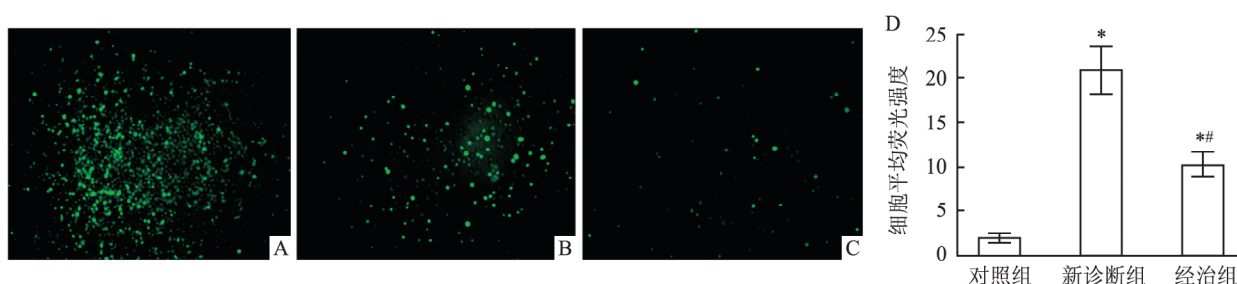


图1 三组骨髓单个核细胞 ROS 表达 $\times 200$

A: 新诊断组; B: 经治组; C: 对照组; D: 三组骨髓单个核细胞平均荧光强度; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与新诊断组比较: # $P < 0.05$

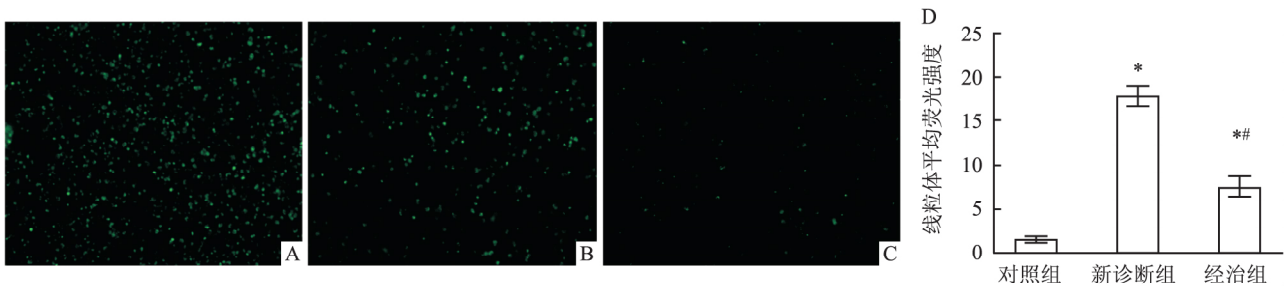


图2 骨髓单个核细胞线粒体 ROS 的表达 ×200

A: 新诊断组; B: 经治组; C: 对照组; D: 三组骨髓单个核细胞线粒体平均荧光强度; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与新诊断组比较: # $P < 0.05$

组间 $F = 13.048$, $P < 0.05$ 。外周血标本稀释 5 倍后 相较于对照组,新诊断组中 SIRT3 的表达下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.0001$); 相较于新诊断组, 经治组中 SIRT3 的表达上调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 组间 $F = 17.740$, $P < 0.05$ 。见图 3。

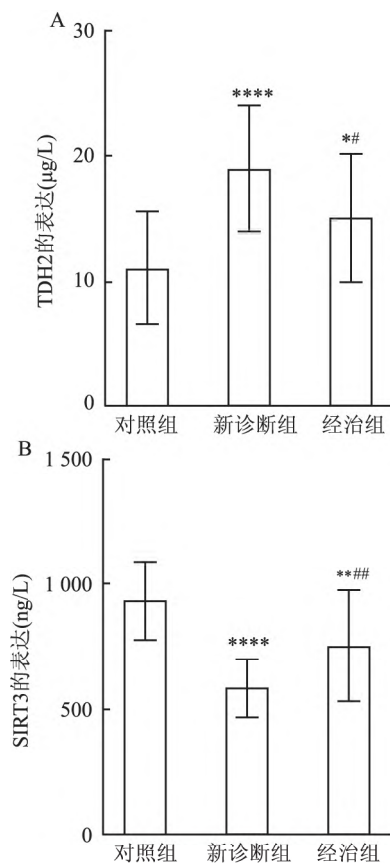


图3 各组间人血浆 IDH2、SIRT3 表达

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$; 与新诊断组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.4 SIRT3 表达水平与融合基因 AML1-ETO 的关系

2.4.1 新诊断 AML 患者 SIRT3 表达水平与融合基因 AML1-ETO 的关系

20 例新诊断 AML 患者中 2

例未进行融合基因检测, 16 例检测阴性; 2 例患者融合基因阳性。融合基因检测阳性组 SIRT3 表达为 (626.73 ± 11.89) ng/L, 融合基因检测阴性组 SIRT3 表达为 (591.54 ± 127.29) ng/L, 比较融合基因阳性组和阴性组 AML 患者 SIRT3 表达水平, 结果显示, 两组间 SIRT3 表达水平差异无统计学意义 ($F = 3.267$, $P > 0.05$)。

2.4.2 经治 AML 患者 SIRT3 表达水平与融合基因 AML1-ETO 的关系

40 例经治 AML 患者中, 7 例未进行融合基因检测, 25 例检测阴性; 8 例患者融合基因阳性。融合基因检测阳性组 SIRT3 表达为 (759.96 ± 114.81) ng/L, 融合基因检测阴性组 SIRT3 表达为 (751.66 ± 241.87) ng/L, 比较融合基因阳性组和阴性组 AML 患者 SIRT3 表达水平, 结果显示, 两组间 SIRT3 表达水平差异无统计学意义 ($F = 0.951$, $P > 0.05$)。

2.5 经治患者 SIRT3 表达水平与治疗疗效之间的关系

40 例经治 AML 患者中, 其中完全缓解 (CR) 者 20 例, 部分缓解 (PR) 者 20 例。完全缓解者, 其 SIRT3 表达为 (722.95 ± 172.33) ng/L; 部分缓解者, 其 SIRT3 表达为 (794.57 ± 259.61) ng/L, 完全缓解者与部分缓解者间 SIRT3 表达水平差异无统计学意义 ($F = 0.156$, $P > 0.05$)。

2.6 经治 CR 患者 SIRT3 表达水平与治疗疗程之间的关系

40 例经治 AML 患者中, 其中完全缓解者 20 例, 根据不同患者治疗疗程, 以中位数 6 个疗程为界, 其中少于等于 6 个治疗疗程 11 例, 其 SIRT3 表达为 (712.79 ± 183.43) ng/L; 高于 6 个治疗疗程 9 例, 其 SIRT3 表达为 (735.36 ± 167.82) ng/L, 两组间 SIRT3 表达水平差异无统计学意义 ($F = 0.190$, $P > 0.05$)。

3 讨论

SIRT3 主要分布于线粒体, 不仅具有去乙酰酶

活性,并且能够靶向多条代谢途径,调节细胞的正常代谢和功能^[6]。文献报道,SIRT3的丢失,与高氧化应激和ROS的产生以及代谢重编程有关,且后者有助于癌症的发生^[7]。有研究^[8]表明,外周血血清与肿瘤细胞中SIRT3的表达有一定的相关性,且其可能成为肿瘤无创性检测的潜在生物标志物。本研究中,白血病患者外周血SIRT3含量均低于对照组,表明在急性髓系白血病的发生发展中,SIRT3可能参与调节细胞的氧化损伤,调控肿瘤的发生发展。而已确诊为AML的患者中,其中新诊断组低于经治组,在经治组中,PR亚组SIRT3水平高于CR亚组,而在经治组中经治疗获得CR的患者中,治疗疗程较短的亚组,其SIRT3水平低于治疗疗程长的亚组,与文献报道一致,提示SIRT3高表达可能参与原发耐药。在后续实验中可进一步扩大实验样本量以明确。IDH2是三羧酸循环中一种关键酶,SIRT3可通过去乙酰化IDH2,以提高细胞抗氧化能力。研究^[9]证明,将稳定表达SIRT3的细胞中的IDH2基因敲除,会导致氧化应激保护完全或几乎完全丧失。本研究结果提示,急性髓系白血病患者IDH2表达均大于对照组,新诊断组表达大于经治组,借此推断白血病细胞氧化还原的动态平衡被打破,而不排除系SIRT3参与的协调作用。融合基因在疾病的诊断、预后及治疗疗效评估中起着重要的作用。本研究中,在新诊断及经治患者中,SIRT3的表达与融合基因AML1-ETO阳性与否无明显关联。但是本研究中新诊断患者只有2例AML1-ETO基因阳性,病例数较少,无法得出统计学意义,不能明确说明SIRT3的表达并不受其影响,需后期增大样本量进一步探究。

氧化应激通常被定义为ROS生成和抗氧化防御系统受损之间的失衡。且已有研究^[10]证明它与癌症的病理生理学有关。本研究结果提示,60例已确诊为急性髓系白血病患者细胞内及线粒体内ROS水平均明显高于对照组,与相关文献^[11]报道相似,表明白血病细胞氧化还原平衡被打破,产生大量ROS。有研究显示,血红素加氧酶-1(haem oxygenase-1,HO-1)可以调节细胞血红素水平,增加抗氧化剂的生成。相较于健康对照组,AML患者的HO-1的表达下调,但针对AML的两种常用化疗药物阿糖胞苷和柔红霉素在诱导细胞凋亡过程中,可以增加HO-1的表达,与治疗前对比有所恢复^[12-13]。上述研究说明,化疗后的白血病细胞抗氧化能力较前提高。本研究中,经治组患者白血病细胞ROS表达低

于新诊断组,表明治疗后患者细胞具有较前增高的抗氧化能力。低表达ROS的肿瘤细胞通常会表现出更高的耐药性,在本研究中,新诊断组ROS表达高于经治组,表明在经多次化学治疗后,治疗疗效较前欠佳。骨髓单个核细胞中线粒体ROS表达也出现同骨髓单个核细胞一样的表现,表明结果稳定可靠。ROS既能诱导肿瘤的发生,又具有抗肿瘤性及参与细胞耐药,ROS在细胞内的水平可以通过SIRT3靶向多种底物以调节线粒体的代谢而调节,那么可以通过调节SIRT3的水平而降低肿瘤细胞的耐药性,使之可能成为潜在的治疗靶点,改善疾病的预后及治疗疗效。

复发、耐药是AML患者治疗效果差的主要原因^[14]。本研究显示在不同疾病状态的AML患者中,SIRT3、IDH2及ROS表达水平相应改变,解释了AML患者耐药的可能机制,但尚未明确SIRT3、IDH2及ROS之间的因果关系,后续可通过建立模型及进一步扩大样本量验证证明。

综上所述,SIRT3在成人急性髓系白血病患者中表达下降,可通过调节氧化应激以增加细胞ROS的产生。SIRT3的异常表达可参与白血病细胞耐药机制。研究SIRT3在急性髓系白血病细胞生长发育中的功能,可作为评估患者诱导治疗及治疗疗效评估的指标。有助于研究出更多具有针对性、特异性的治疗药物,改善预后,降低复发率。

参考文献

- [1] Khwaja A ,Bjorkholm M ,Gale R E ,et al. Acute myeloid leukaemia [J]. *Nat Rev Dis Primers* 2016 2: 16010.
- [2] Sung H ,Ferlay J ,Siegel R L ,et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin* ,2021 ,71(3): 209-49.
- [3] Ravandi F ,Pierce S ,Garcia-Manero G ,et al. Salvage therapy outcomes in a historical cohort of patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* , 2020 20(11): e871-82.
- [4] Nogueira V ,Hay N. Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res* 2013 ,19(16): 4309-14.
- [5] Ma J ,Liu B ,Yu D ,et al. SIRT3 deacetylase activity confers chemoresistance in AML via regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation [J]. *Br J Haematol* ,2019 ,187(1): 49-64.
- [6] Vassilopoulos A ,Fritz K S ,Petersen D R ,et al. The human sirtuin family: evolutionary divergences and functions [J]. *Hum Genomics* ,2011 5(5): 485-96.
- [7] Torrens-Mas M ,Oliver J ,Roca P ,et al. SIRT3: oncogene and

- tumor suppressor in cancer[J]. *Cancers (Basel)* 2017 9(7):90.
- [8] Tao F , Gu C , Li N , et al. SIRT3 acts as a novel biomarker for the diagnosis of lung cancer [J]. *Medicine (Baltimore)* ,2021 ,100(27): e26580.
- [9] Yu W , Dittenhafer-Reed K E , Denu J M. SIRT3 protein deacetylates isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) and regulates mitochondrial redox status[J]. *J Biol Chem* 2012 287(17): 14078 – 86.
- [10] Valko M , Rhodes C J , Moncol J , et al. Free radicals , metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer[J]. *Chem Biol Interact* ,2006 ,160(1): 1 – 40.
- [11] Al-Gayyar M M , Eissa L A , Rabie A M , et al. Measurements of oxidative stress status and antioxidant activity in chronic leukaemia patients[J]. *J Pharm Pharmacol* ,2007 59(3): 409 – 17.
- [12] Irwin M E , Rivera-Del Valle N , Chandra J. Redox control of leukemia: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities[J]. *Antioxid Redox Signal* ,2013 ,18(11): 1349 – 83.
- [13] Heasman S A , Zaitseva L , Bowles K M , et al. Protection of acute myeloid leukaemia cells from apoptosis induced by front-line chemotherapeutics is mediated by haem oxygenase – 1 [J]. *Oncotarget* ,2011 ,2(9): 658 – 68.
- [14] 陈玲琳 熊术道 高申孟. HOTAIR 在急性髓细胞性白血病中的表达及其对柔红霉素耐药的作用机制[J]. *安徽医科大学学报* 2020 55(11): 1676 – 80.

Expression of SIRT3 in acute myeloid leukemia

Zhang Yan , Yang Mingzhen

(*Dept of Hematology ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022*)

Abstract Objective To observe the dynamic changes of reactive oxygen species (ROS) , isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) and sirtuin 3 (SIRT3) in patients with acute myeloid leukemia (AML) before and after chemotherapy , and to explore the differences of ROS , IDH2 and SIRT3 levels in different AML patients and their application value in clinical diagnosis and efficacy evaluation. **Methods** Bone marrow and peripheral blood samples were taken from 20 newly diagnosed AML (non-APL) patients who had not received chemotherapy (new diagnosis group) ; bone marrow and peripheral blood samples were taken from 40 AML (non-APL) patients who had received chemotherapy (by Treatment group) ; 20 normal human bone marrow and peripheral blood samples were taken as control (control group) . The expression of ROS in bone marrow mononuclear cells and mitochondria of bone marrow mononuclear cells in each group was observed under a fluorescence microscope , and the expressions of IDH2 and SIRT3 in peripheral blood of each group were determined by ELISA. The expression of AML1-ETO fusion gene in patients was summarized , and the expression of SIRT3 in different groups was compared. The expression of SIRT3 in different treatment effects and treatment courses in the treated patients were compared. **Results** The expression of mitochondrial ROS in bone marrow mononuclear cells and cells in the three groups was higher in the newly diagnosed group than that in the control group ($P < 0.05$) , and lower in the treated group than that in the newly diagnosed group ($P < 0.05$) . The expression of IDH2 in peripheral blood of the three groups was higher in the newly diagnosed group than that in the control group ($P < 0.0001$) , and lower in the treated group than that in the newly diagnosed group ($P < 0.05$) . After peripheral blood samples were diluted 5 times , the expression of SIRT3 in the newly diagnosed group was lower than that in the control group ($P < 0.0001$) ; the expression of SIRT3 in the treated group was higher than that in the newly diagnosed group ($P < 0.01$) . The SIRT3 expression of fusion gene-positive patients was higher than that of fusion gene-negative patients; the SIRT3 expression of partial remission patients was higher than that of complete remission patients; the SIRT3 expression of patients with complete remission in the subgroup of previously treated patients was higher than that of patients with a longer treatment course than those with a short treatment course. **Conclusion** SIRT3 is an important protein that regulates metabolic function in the mitochondria of cells. Its expression is down-regulated in patients with acute myeloid leukemia , and the expressions of IDH2 and ROS increased accordingly. In AML , the abnormal expression of SIRT3 can accelerate the occurrence and development of tumor and reduce the therapeutic effect.

Key words sirtuin 3; acute myeloid leukemia; reactive oxygen species; isocitrate dehydrogenase 2; mitochondria