

血清胸苷激酶 1 在儿童急性淋巴细胞白血病诊疗中的应用^{*}

徐文鑫¹, 梅序桥², 刘慧丽¹ (1. 漳州卫生职业学院, 福建漳州 363000; 2. 福建医科大学附属漳州市医院检验科, 福建漳州 363000)

【摘要】 目的 探讨血清胸苷激酶 1 (sTK1) 在儿童急性淋巴细胞白血病临床诊疗中的应用。**方法** 采用免疫印迹增强化学发光法检测 39 例急性淋巴细胞白血病儿童患者化疗前、化疗后的 sTK1 浓度及 30 例同期健康体检儿童的 sTK1 浓度。**结果** 患儿组化疗前的 sTK1 浓度明显高于化疗后完全缓解组、部分缓解组及对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 化疗后不同疗效组 (完全缓解组、部分缓解组、未缓解组) 之间 sTK1 浓度差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 未缓解组与化疗前的 sTK1 浓度差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 化疗前 sTK1 阳性检出率明显高于化疗后及对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** sTK1 的检测对于儿童急性淋巴细胞白血病的筛查、辅助诊断、化疗效果的评估具有重要参考价值。

【关键词】 血清胸苷激酶 1; 儿童急性淋巴细胞白血病; 免疫印迹增强化学发光法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.16.006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)16-2311-03

Application of serum thymidine kinase 1 in diagnosis and treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia^{*} XU Wen-xin¹, MEI Xu-qiao², LIU Hui-li¹ (1. Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou, Fujian 363000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Zhangzhou Municipal Hospital of Fujian Medical University, Zhangzhou, Fujian 363000, China)

【Abstract】 Objective To study the clinical application of serum thymidine kinase 1 (sTK1) in the diagnosis and treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Methods** The Western blot-enhanced chemiluminescence assay was adopted to detect serum TK1 level in 39 cases of childhood acute lymphoblastic leukemia patients before and after chemotherapy and contemporaneous 30 healthy children. **Results** The sTK1 level before chemotherapy in the patients group was higher than that in the complete remission group and the partial remission group after chemotherapy, and the healthy control group, the differences were statistically significant ($P < 0.01$); the sTK1 level had statistical differences among different curative effect groups after chemotherapy (complete remission group, partial remission group and non-remission group) ($P < 0.01$); the sTK1 level had no statistical difference between the non-remission group and before chemotherapy ($P > 0.05$); the positive detection rate of sTK1 before chemotherapy was significantly higher than that after chemotherapy and the healthy control group ($P < 0.01$). **Conclusion** The sTK1 detection has the important reference value for screening, assisted diagnosis and evaluation of chemotherapeutic effect in childhood acute lymphoblastic leukemia.

【Key words】 serum thymidine kinase 1; childhood acute lymphoblastic leukemia; western blot-enhanced chemiluminescence assay

急性淋巴细胞白血病 (ALL) 在儿童白血病中发病率最高, 有研究报道其占整个儿童白血病的 75% 以上, 严重威胁着儿童健康^[1]。临床上, 对于儿童 ALL 的诊断及化疗疗效观察, 依赖于骨髓穿刺、细胞病理检查等手段。减少骨髓穿刺和细胞病理检查次数, 寻找其他辅助检查指标对疾病进行初筛、辅助诊断、疗效观察, 成为很多学者研究探索的方向。胸苷激酶 (TK) 是参与 DNA 补救合成途径的关键酶, 细胞质胸苷激酶 (TK1) 是 TK 的一种同工酶, 是一种细胞周期依赖性标志物, 是与细胞的 DNA 合成和细胞增殖密切相关的关键酶^[2]。在肿瘤细胞内, DNA 复制循环加速, 大量肿瘤细胞在 S/G2 期死亡, 高浓度的 TK1 释放到外周血, 所以 TK1 在恶性肿瘤细胞和恶性淋巴瘤患者血液中升高。本研究利用免疫印迹增强化学发光法检测 30 例健康儿童和 39 例 ALL 患儿化疗前及化疗后 sTK1

浓度变化, 探讨 sTK1 在儿童急性淋巴细胞性白血病临床诊断中的价值及疗效评估中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取福建医科大学附属漳州市医院儿科 2012 年 4 月至 2014 年 2 月经骨髓形态学、病理细胞学以及流式细胞术免疫学分型等检查确诊的 ALL 患儿 39 例, 年龄 1~10 岁, 平均 (5.7 ± 1.1) 岁; 另取本院同期健康体检儿童 30 例作为对照组, 年龄 1~12 岁, 平均 (5.2 ± 2.7) 岁。化疗 1 个疗程后, 根据治疗结果将患儿组分为完全缓解组、部分缓解组及未缓解组, 以各组研究对象的空腹血清作为检测标本, 标本采取时间分别为患儿组初次化疗前及化疗 1 个疗程后, 健康对照组标本采取时间为体检时。患儿 ALL 的诊疗标准均按照 2006 年中华医学会儿科学分会血液学组制定的儿童 ALL 诊

^{*} 基金项目: 福建省教育厅科技项目 (JB12320)。

作者简介: 徐文鑫, 男, 讲师, 本科, 主要从事临床实验诊断学教学工作。

疗建议进行。上述所有研究对象均排除其他肿瘤性疾病、传染性疾病以及炎症疾病。

1.2 仪器与试剂 试验所使用的主要仪器为化学发光数字成像分析仪,试剂是 sTK1 诊断试剂,均购自华瑞同康生物技术(深圳)有限公司。根据试剂盒说明书,以 2 pmol/L 作为 sTK1 的水平临界值,sTK1>2 pmol/L 即为检出阳性。

1.3 方法 采用真空干燥管抽取空腹静脉血 3~5 mL,在 2 h 内以 3 000 r/min 离心 15 min,分离血清,将血清分装于干燥离心管内,保存于-20 ℃ 备检。标本收集完后,以试剂盒中的标准品为参照,在标准曲线 $r\geq 0.95$ 的情况下进行测定,严格参照试剂盒提供的操作说明进行。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据处理及统计学分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组 sTK1 浓度比较 患儿组化疗前的 sTK1 值明显高于化疗后的完全缓解组、部分缓解组及对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);完全缓解组与部分缓解组及未缓解组的 sTK1 水平差异有统计学意义($P<0.01$);未缓解组 sTK1 水平也明显高于部分缓解组,差异有统计学意义($P<0.01$);未缓解组与化疗前组的 sTK1 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组 sTK1 浓度比较($\bar{x}\pm s$,pmol/L)

组别	<i>n</i>	sTK1 浓度
化疗前	39	4.00±1.39 [*]
完全缓解	19	1.05±0.31 ^{**}
部分缓解	14	1.78±0.39 ^{***}
未缓解	6	3.56±0.64 [#]
对照组	30	0.67±0.43

注:与完全缓解组、部分缓解组、对照组比较,^{*} $P<0.01$;与部分缓解组、未缓解组比较,^{**} $P<0.01$;与未缓解组比较,^{***} $P<0.01$;与化疗前组比较,[#] $P>0.05$ 。

2.2 化疗前、化疗后及对照组血清 sTK1 阳性检出率 患儿组化疗前阳性率明显高于化疗后及对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);患儿组化疗后阳性率也明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 患儿组与对照组 sTK1 阳性检出情况比较

组别	<i>n</i>	阳性(<i>n</i>)	阴性(<i>n</i>)	阳性率(%)
化疗前	39	34	5	87.1
化疗后	39	8	31	20.5
对照组	30	1	29	3.4

3 讨 论

白血病是常见的血液恶性肿瘤,我国每年有 2 万例左右儿童白血病发生,在儿童白血病发病率中又以 ALL 为主。ALL 是一种异质性疾病,表现为原幼淋巴细胞在造血组织中恶性增殖和克隆。近年来,随着免疫学、分子生物学及细胞遗传学的发展,人类深入了解了儿童 ALL 病因和发病机制,在诊断、治疗上得到了长足的进步,使得大多数 ALL 患儿经化疗后都能得到缓解。近年儿童 ALL 的无病生存率(EFS)已达 80%以

上。但在临床上,对于儿童 ALL 的诊断、化疗疗效观察及预后监测,目前还是缺乏可靠的血清学检测指标,仍依赖于骨髓形态学、细胞病理检查最终确定。骨髓穿刺是一种具有创伤性的标本采集手段,对患儿的身心造成一定的影响,特别是对儿童本身及其家属带来很大的心理生理负担。是否有一种血清学检测指标能对儿童 ALL 进行初筛、辅助诊断、疗效观察及预后监测,减少骨髓穿刺进行细胞病理检查次数,成为目前不断探索的方向。

TK 是调控 DNA 合成的关键酶之一,在 ATP 为供体及镁离子(Mg^{2+})参与的条件下,催化胸苷磷酸(Thd)为胸苷一磷酸(TMP),是胸腺嘧啶核苷进入 DNA 代谢,参与合成 DNA 的唯一途径。TK 的两种同工酶分别为 TK1 和线粒体胸苷激酶(TK2),TK1 主要存在于细胞质中^[3]。TK1 是细胞周期依赖性标志物,在细胞内的表达水平与细胞周期有关,细胞分裂 G1 期含量比较低,在 G1 期到 S 期交界处逐渐升高,至 S 期达到最高,其高水平持续在 S 期到 G2 期,至 M 期才开始降解^[4]。肿瘤细胞的增殖不同于正常细胞,其增殖不受凋亡调控,DNA 复制循环加速,当组织中 S 期细胞比例升高,大量肿瘤细胞在 S/G2 期死亡,高浓度的 TK1 释放到外周血,引起体内 TK1 升高。正常细胞在 G1 期死亡,此时细胞中 TK1 浓度很低,释放到外周血的 TK1 浓度极微^[5]。TK1 是一种新兴的肿瘤细胞增殖标志物,大量研究表明,血清 sTK1 浓度检测在鼻咽癌、食管癌、胃癌、乳腺癌、宫颈癌、肝癌等实体癌症的辅助诊断、疗效评估、病情监测及预后判断都具有临床意义^[6-8]。但对 TK1 在血液肿瘤的治疗评估中应用研究最早的是 TK1 活性检测。Gronowitz 等^[9]通过大量临床试验证明 TK1 活性不仅可用于血液肿瘤的早期诊断,并可提示化疗疗效及预测疾病预后,与已知的肿瘤特异性标志物结合提高诊断敏感性方面也有很大价值。徐卫等^[10]发现 ALL 患者 sTK1 表达水平与 ALL 其他预后因素相关,在 ALL 的预后中具有重要价值。TK1 活性检测主要采用放射免疫法,由于放免法存在放射性污染,技术要求比较高,难于在临床上推广。He 等^[11]采用免疫印迹增强化学发光法检测 sTK1 浓度,发现 sTK1 浓度对于白血病化疗效果的评估及临床化疗方案的调整也具有重要的临床意义。曾智杰等^[12]研究表明 sTK1 的浓度可用于血液肿瘤化疗效果的评估,以及指导临床进行化疗方案的调整。sTK1 浓度检测在血液病临床诊治中的价值也得到重视,但目前相对研究还是较少。

本研究以儿童 ALL 患儿为研究对象,并以健康体检儿童作为对照组,对患儿组化疗前及化疗后(完全缓解组、部分缓解组、未缓解组)血清和对照组血清进行 sTK1 浓度检测,对组别的 sTK1 浓度及阳性率进行比较。试验结果显示,患儿组化疗前 sTK1 浓度为(4.00±1.39)pmol/L,阳性率为 87.1%;对照组 sTK1 浓度为(0.67±0.43)pmol/L,阳性率为 3.4%,患儿组化疗前的 sTK1 浓度及阳性率明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),说明了 ALL 患儿骨髓造血干细胞的恶性增殖,白血病细胞在骨髓和其他造血组织中大量增生,白血病细胞中的 TK1 大量释放进入血液中,导致血液中 TK1 浓度升高。提示 sTK1 可作为儿童 ALL 的筛查、辅助诊断的血清学标志物。

本研究同时对化疗 1 个疗程后的 39 例研究对象根据疗效结果分为完全缓解组(19 例)、部分缓解组(14 例)、未缓解组(6 例),完全缓解组的 sTK1 浓度为(1.05±0.31)pmol/L,部分缓

解组的 sTK1 浓度为 (1.78 ± 0.39) pmol/L,未缓解组的 sTK1 浓度为 (3.56 ± 0.64) pmol/L,3 组间两两比较,sTK1 水平差异均有统计学意义($P < 0.01$),同时化疗前 sTK1 浓度也明显高于完全缓解组及部分缓解组,差异有统计学意义($P < 0.01$),但化疗前 sTK1 浓度与未缓解组差异无统计学意义($P > 0.05$)。这提示着儿童 ALL 在有效的化疗之后,完全缓解及部分缓解的患儿骨髓中造血干细胞异常增殖被不同程度地有效抑制,白血病患者在造血组织中大量减少,血液中 sTK1 浓度降低,在骨髓细胞病理学的疗效判断标准中,完全缓解患儿骨髓中的原幼淋巴细胞降至 5%以下,部分缓解组的患儿骨髓内的原幼淋巴细胞降至 5%至 20%,可以发现 sTK1 浓度结果与 ALL 疗效判断标准中骨髓细胞病理学检查结果是相符的。从 sTK1 检出阳性率结果也显示,化疗后的阳性率(20.5%)与化疗前的阳性率(87.1%)差异有统计学意义。综上所述,sTK1 浓度对于儿童 ALL 的疗效监测及指导治疗方案的调整具有重要意义。

本研究初步表明,sTK1 浓度作为儿童 ALL 的初筛、辅助诊断具有一定的参考价值,并在儿童化疗疗效评估上也具有重要临床意义。但本研究病例有限,缺少良性疾病的对照,研究结论有一定局限性,今后应通过增加病例及良性病种的深入研究,探讨 sTK1 在临床上的价值。

参考文献

[1] 刘壮,张义堂,吴香苓,等. p73 基因在儿童急性淋巴细胞白血病的表达[J]. 临床儿科杂志,2010,28(5):410-413.

[2] Gronowitz SJ,Kallander FR,Diderholm H,et al. Application of an in vitro assay serum thymidine kinase: results on viral disease and malignancies in humans[J]. Int J Cancer,1984,33(1):5-12.

[3] Schrappe M,Reiter A,Ludwig WD,et al. Improved out-

come in child-hood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracycline and cranial radiotherapy: Results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group[J]. Blood,2000,95(11):3310-3322.

[4] Madhoun A,Tjarks W,Eriksson S. The role of thymidine kinases in the activation of pyrimidine nucleoside analogues[J]. Mini Rev Med Chem,2004,4(4):341-350.

[5] Karp G. Cell and molecular biology[M]. USA: Wiley International Edition,2005:6699.

[6] 陈凯,于在成. 血清胸苷激酶 1 检测在食管癌诊治中的应用[J]. 蚌埠医学院学报,2013,38(4):424-426.

[7] 任若冰,李亚芬. 血清胸苷激酶 1 在乳腺肿瘤中的表达及其临床意义[J]. 中国癌症杂志,2014,24(1):41-45.

[8] 王静,陶健. 卵巢癌患者联合检测血清 TK1、CA125 的临床价值[J]. 中华全科医学,2014,12(6):975-976.

[9] Gronowitz JS,Hagberg H,Kllander CFR,et al. The use of serum deoxythymidine kinase as a prog-nostic marker, and in the monitoring of patients with non-Hodgkin's lymphoma[J]. Br J Cancer,1983,47(4):487-495.

[10] 徐卫,沈秋丹,于慧,等. 慢性淋巴细胞白血病患者脂蛋白酯酶和血清胸苷激酶水平及与其他预后因素的相关性研究[J]. 中国血液学杂志,2009,30(1):23-26.

[11] He Q,Wu J,Merza M,et al. Cytosolic thymidine kinase is a specific histopathologic tumour marker for breast carcinomas[J]. Int Journal oncol,2004,25(4):945-953.

[12] 曾智杰,欧阳文婷. 胸苷激酶 1 在白血病患者化疗过程中的临床意义探讨[J]. 分子诊断与治疗杂志,2009,1(1):28-30.

(收稿日期:2015-02-28 修回日期:2015-05-20)

(上接第 2308 页)

报道。多耐药结核病特异性的细胞免疫,发挥抗结核免疫调节作用。诚然,深入研究复方中药在多耐药结核病中的免疫调节作用或许是对抗耐药结核治疗是一个有益的帮助。

参考文献

[1] Organization WH. Global tuberculosis control 2010[J]. Global Tuber Control,2010,10(4):2179-2191.

[2] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Extensively drug-resistant tuberculosis—United States, 1993-2006[J]. J Am Med Assoc,2007,56(23):250-253.

[3] Chiang CY, Van WC, Mori T, et al. Challenges to the global control of tuberculosis[J]. Respirology, 2013, 18 (4):596-604.

[4] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断与治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志,2001,24(2):70-74.

[5] 钟炳图. 黄芪注射液佐治耐药肺结核疗效观察[J]. 浙江中西医结合杂志,2004,14(2):83-84.

[6] 蒋成全. 中药抗结核杆菌的研究概况[J]. 中国实用医药, 2007,2(22):95.

[7] 袁修德,袁媛,吴激波,等. 益肺止血汤治疗肺结核咯血的临床效果观察[J]. 检验医学与临床,2014,11(10):1375-1376.

[8] Chen X,Zhou B,Li M,et al. CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease [J]. Clin Immunol, 2007,123(1):50-59.

[9] 胡良安,李岱荣,罗永艾,等. CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ 调节性 T 细胞抑制肺结核特异细胞免疫[J]. 基础医学与临床, 2012,32(2):181-185.

[10] Wu Y, Peng W, Cai Y, et al. Decrease in CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg cells after pulmonary resection in the treatment of cavity multidrug-resistant tuberculosis[J]. Int J Infect Dis,2010,14(9):815-822.

(收稿日期:2015-02-10 修回日期:2015-04-20)