

肿瘤临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002635

急性髓系白血病患者早期血清 CCN1 蛋白检测及临床价值

雷胡芯¹, 牛长春¹, 杨程², 廖璞¹

(1. 西南医科大学临床医学院检验科, 泸州 646000; 2. 陆军军医大学新桥医院血液科, 重庆 400042)

【摘要】目的:研究 CCN1 蛋白在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者早期血清中的表达水平及其与临床特征的相关性,探讨 CCN1 在早期急性髓系白血病中的诊断价值。**方法:**收集 96 例急性髓系白血病早期患者和 159 名同年龄段、性别匹配的健康对照者血清样本,采用 ELISA 检测血清中的 CCN1 蛋白水平,通过 ROC 曲线评估其作为诊断标志物的价值;比较 CCN1 表达水平与临床特征的相关性;分析不同 AML 分型分组中的血清 CCN1 表达是否具有差异。**结果:**AML 早期患者血清中的 CCN1 表达水平明显低于健康对照组($P=0.000$),ROC 曲线下面积为 0.823,最佳 cut-off 值是 101.22 pg/mL,灵敏度为 0.823,特异度为 0.667。CCN1 表达水平与临床特征无相关性。AML 不同分型与对照组均有统计学差异($P=0.000$),但 AML 各型之间的 CCN1 差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**CCN1 蛋白在急性髓系白血病早期患者和正常人血清中表达差异显著,因此 CCN1 在急性髓系白血病早期诊断中可能有诊断价值。

【关键词】CCN1;急性髓系白血病;ROC 曲线**【中图分类号】**R446**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-06-03

Detection and clinical significance of serum CCN1 protein in patients with early acute myeloid leukemia

Lei Huxin¹, Niu Changchun¹, Yang Cheng², Liao Pu¹

(1. Department of Laboratory Medicine, The Clinical Medical School of Southwest Medical University;

2. Department of Hematology, Xinqiao Hospital of Army Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate correlation between the serum concentrations of CCN1 protein and its clinical features, and to explore the diagnostic value of CCN1 in early acute myeloid leukemia (AML) patients. **Methods:** Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied for detecting the concentrations of serum CCN1 protein in 96 early AML patients and 159 control healthy people. ROC curve was used to assess the diagnostic value of CCN1 in early AML patients. The concentrations of serum CCN1 between the distinct clinical features groups and the classification groups were compared. **Results:** The concentrations of serum CCN1 protein in 96 early AML patients were significantly lower than those in healthy controls ($P=0.000$). The area under the ROC curve was 0.823, and the optimal cut-off value was 101.22 pg/mL (sensitivity=0.823, specificity=0.667). The concentrations of serum CCN1 protein had no correlation with clinical features. There were significant differences between different AML classification types and the control groups ($P=0.000$), but no significant difference was observed among CCN1 of AML types ($P>0.05$). **Conclusion:** The concentrations of serum CCN1 protein in early AML patients are significantly different from those in control groups, which suggests that serum CCN1 protein concentration is a biomarker with broad application prospect for early AML diagnosis.

【Key words】CCN1; acute myeloid leukemia; ROC curve

作者介绍: 雷胡芯, Email: 506670964@qq.com,

研究方向: 电致化学发光免疫分析策略构建。

通信作者: 廖璞, Email: liaopu2015@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81702075); 重庆市自

然科学基金资助项目(编号: cstc2019jcyj-msxmX0276)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200902.1431.002.html>

(2020-09-03)

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一种由未分化的髓系前体克隆扩增导致造血功能受损和骨髓衰竭的一类恶性造血干/祖细胞疾病。AML 患者常常出现贫血、出血、发热等临床表现,且白血病细胞可浸润肝、脾、淋巴结等重要脏器,大多数病情急重,死亡率高。由于急性髓系白血病的诊断具有一定的难度和时间耗费,因此,寻找能早期快速诊断急性髓系白血病的标志物对临床诊疗具有重要意义^[1-4]。

CCN1 是一种富含半胱氨酸的基质细胞蛋白质,由骨髓基质细胞分泌,参与各种细胞黏附、迁移等活动,且具有多样性。本研究旨在探讨 AML 早期患者血清 CCN1 蛋白表达水平与患者临床特征之间的相关性,以及是否可以作为临床辅助诊断的标志物。

1 材料和方法

1.1 一般资料

2018 年 7 月至 2019 年 7 月在陆军军医大学附属新桥医院和重庆市人民医院血液科初次诊断为急性髓系白血病且未接收任何形式治疗的患者 96 例,平均年龄 46.9 岁,男 51 例,女 45 例,诊断标准根据 2016 年最新标准。正常健康对照 159 例,平均年龄 46.5 岁,男 77 例,女 82 例。纳入标准:参照 FAB 和 WHO 的急性髓系白血病分类诊断患者。排除标准:接受造血干细胞移植的患者。没有自我报告的癌症病史或已知的血液病症的健康受试者被登记为对照。AML 患者和健康对照者提供了知情同意书,该研究经重庆市人民医院伦理委员会批准。此外,作者无法获得在数据收集期间或之后的参与者信息。

1.2 试剂与仪器

CCN1 ELISA 试剂盒购自美国 Bio-Techne 公司,酶标仪为 Thermo MK3 酶标仪。

1.3 方法

所有研究对象均进行外周血 CCN1 检测,所采取的患者静脉血于 3 000 r/min 离心 10 min,留取血清后于 -80℃ 冰箱冷冻保存以便后续实验检测。使用 Thermo MK3 酶标仪及 CCN1 ELISA 试剂和测定 CCN1,在保证当日检测时质量控制均在控的条件下,于同一批次进行检测。比较 AML 患者血清的 CCN1 水平和健康对照者血清的 CCN1 水平差异;利用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)确定 CCN1 最佳截点;将 AML 患者通过 FAB 分型分为 M0、M1、M2、M3、M4、M5、M6 共 7

组,分析各组间的临床特征性差异。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,两独立样本均数比较采用 *t* 检验;单因素多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD 法检测,相关性分析采用 Pearson 相关分析。采用 ROC 曲线评价 CCN1 在 AML 患者血清中的诊断价值。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 CCN1 在 AML 组与对照组中的表达水平

用 ELISA 检测 AML 组与对照组中 CCN1 的表达水平并进行比较分析。结果显示,AML 组(75.80 ± 32.65)的 CCN1 表达水平明显低于对照组(126.50 ± 47.80),差异具有统计学意义($P=0.000$)。

2.2 CCN1 的 ROC 曲线和临床效能评价

根据 AML 组和对照组的 CCN1 水平绘制 ROC 曲线(图 1)。结果分析显示,ROC 曲线下面积为 0.823(95%CI=0.770~0.876),灵敏度为 0.823,特异度为 0.667,尤登指数为 0.499,准确度为 72.5%,阳性预测值为 59.8%,阴性预测值为 86.2%,患病率为 37.6%,阳性似然比为 2.471,阴性似然比为 0.265,优势比为 9.325。根据尤登指数的最大值确定最佳 cut-off 值为 101.22 pg/mL。

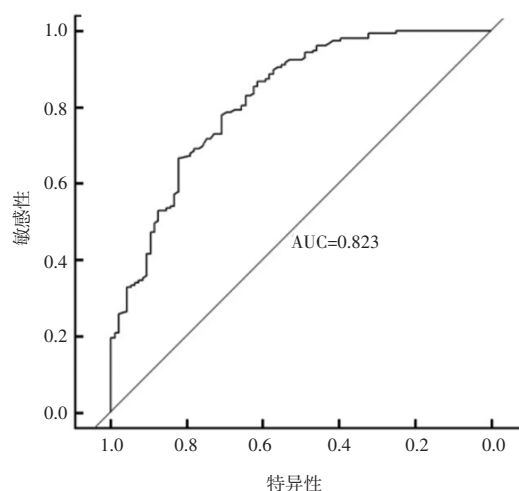


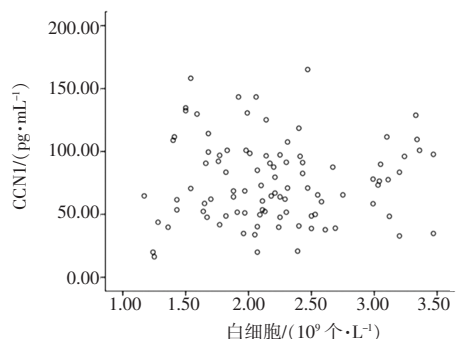
图 1 AML 患者中的 CCN1 的 ROC 曲线分布

2.3 CCN1 在 AML 患者临床特征中的表达水平

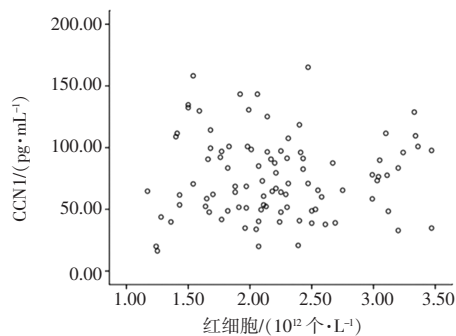
将 AML 患者年龄、性别等进行分组,分析不同组别之间 CCN1 的表达水平及统计学差异。结果显示,AML 组中 CCN1 的表达水平与患者年龄、性别无相关性(表 1),且 CCN1 与血常规中的白细胞计数、红细胞计数、血小板计数水平相关系数分别为 0.061、0.022、0.019,均没有相关性(图 2)。

表 1 CCN1 表达水平与临床特征的关系 ($\bar{x} \pm s$)

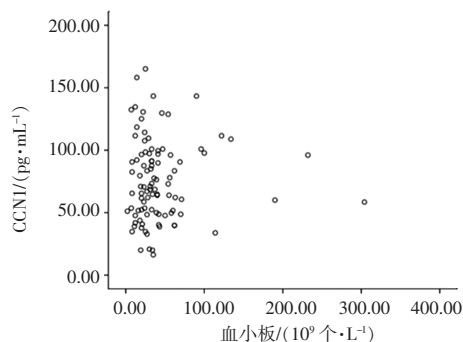
临床特征	CCN1 表达水平	P 值
性别		0.408
男 (n=51)	77.3 ± 30.5	
女 (n=45)	74.1 ± 35.2	
年龄/岁		0.650
<40 (n=28)	75.6 ± 37.5	
40~ (n=46)	78.5 ± 34.5	
60~ (n=22)	70.5 ± 20.3	
白细胞计数/(10^9 个·L ⁻¹)		0.673
<10 (n=29)	79.6 ± 31.3	
10~ (n=38)	71.8 ± 32.3	
50~ (n=29)	77.3 ± 35.0	
红细胞计数/(10^{12} 个·L ⁻¹)		0.445
<2 (n=36)	79.1 ± 36.6	
≥2 (n=60)	73.8 ± 30.2	
血小板计数/(10^9 个·L ⁻¹)		0.669
<100 (n=89)	75.4 ± 33.0	
≥100 (n=7)	80.9 ± 30.0	



A. CCN1 水平与白细胞计数的关系



B. CCN1 水平与红细胞计数的关系



C. CCN1 水平与血小板计数的关系

图 2 急性髓系白血病患者 CCN1 水平与白细胞、红细胞、血小板计数的关系

2.4 CCN1 在 AML 分型中的表达水平

96 例 AML 患者免疫分型中, M2(35.4%)、M3(13.5%)、M4(24.0%)、M5(18.8%) 型较多, M0、M1、M6 型较少。M2、M3、M4、M5 各组均与对照组进行单因素变量方差分析, 两两之间进行比较, 各分组与对照组之间均具有统计学差异 ($P=0.000$), 其余各组间具有一定差异, 但无统计学差异 ($P>0.05$) (图 3)。

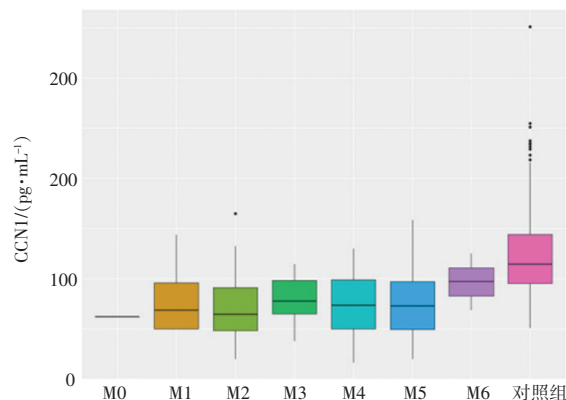


图 3 不同 AML 免疫分型的 CCN1 水平与对照组比较

3 讨论

CCN1 是一种富含半胱氨酸的细胞外基质蛋白, 可介导许多细胞活动, 包括细胞黏附、迁移、增殖和分裂, 同时可作为一种细胞黏附蛋白, 通过与特定整合素结合, 影响内皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞、单核细胞和血小板的黏附活性^[5-6]。因其功能的多样性, CCN1 既可促进细胞存活^[7], 也可引发细胞凋亡^[8]; 既能增强细胞增殖, 也能诱导细胞周期停滞; 既可促进肿瘤生长, 也可抑制各种情况下发病^[9]。CCN1 在不同疾病中扮演不同角色, 如在乳腺癌^[10]、结直肠癌^[11]、恶性胶质瘤^[12]等肿瘤组织中上调, 在前列腺癌^[13]、非小细胞肺癌^[14]等肿瘤组织中下调。在人外周血清 CCN1 的蛋白浓度研究中, 子痫前期的 CCN1 下调^[15]、急性肾损伤的 CCN1 下调^[16]、急性心肌梗死的 CCN1 上调^[17]、结直肠癌的 CCN1 上调^[18], 提示 CCN1 在不同疾病中不同部位的表现不一致, 这与 CCN1 的功能多样化有密切的联系。

本实验发现, 初次诊断为急性髓系白血病且未接收任何形式治疗的患者外周血清中 CCN1 蛋白浓度低于健康对照组, 也就意味着在 AML 患者早期外周血清中 CCN1 蛋白浓度是降低的, 且可作为早期

诊断 AML 的血清标志物。文献报道,在 AML 患者骨髓中的 CCN1 是升高的,且通过 MEK/ERK 途径上调 c-Myc 和 Bcl-xL 并下调 Bax 来正向调控急性髓系白血病的发展进程^[19]。在 AML 早期,CCN1 由骨髓基质细胞分泌并排出胞外,与整合素形成复合物,进入血管内皮细胞,参与血管形成,这一过程大量消耗由骨髓分泌到血清中的 CCN1,骨髓基质细胞来不及补充足够的 CCN1 进入血清,因此 AML 早期外周血清 CCN1 降低,对早期诊断 AML 患者有非常大的意义。由于本实验主要研究 AML 患者早期血清 CCN1 的表达水平及相关临床关系,故并未跟踪到治疗缓解及预后等信息。后续会重新设计课题方案来研究 AML 进展期治疗后缓解与未缓解患者血清 CCN1。

本实验根据 AML 早期患者和健康对照组外周血清 CCN1 水平绘制 ROC 曲线,结果显示 ROC 曲线下面积为 0.823(95%CI=0.770~0.876),可认为筛查价值较高;根据尤登指数的最大值确定最佳 cut-off 值为 101.22 pg/mL,灵敏度为 0.823,特异度为 0.667,进一步提示 CCN1 的诊断价值较高。

综上所述,CCN1 的表达水平与急性髓系白血病早期诊断具有相关性,有望作为急性髓系白血病早期诊断的肿瘤标志物。CCN1 的表达与急性髓系白血病分型和临床特征均无统计学差异,鉴于样本量太少,还需要扩大样本量进行分析。将来是否能作为临床精准治疗和判断临床预后带来指导意义,需要深入研究与探讨。

参 考 文 献

- [1] Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia[J]. Blood Rev, 2017, 31(1): 63-76.
- [2] López-Pedrerá C, Villalba JM, Siendones E, et al. Proteomic analysis of acute myeloid leukemia; identification of potential early biomarkers and therapeutic targets[J]. Proteomics, 2006, 6(Suppl 1): S293-S299.
- [3] Kwak JY, Ma TZ, Yoo MJ, et al. The comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for acute myeloid leukemia[J]. Exp Hematol, 2004, 32(9): 836-842.
- [4] Marcucci G, Mrózek K, Bloomfield CD. Molecular heterogeneity and prognostic biomarkers in adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics[J]. Curr Opin Hematol, 2005, 12(1): 68-75.
- [5] Leu SJ, Lam SC, Lau LF. Pro-angiogenic activities of CYR61(CCN1) mediated through integrins α v β 3 and α 6 β 1 in human umbilical vein endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(48): 46248-46255.
- [6] Chen N, Chen CC, Lau LF. Adhesion of human skin fibroblasts to Cyr61 is mediated through integrin α 6 β 1 and cell surface heparan sulfate proteoglycans[J]. J Biol Chem, 2000, 275(32): 24953-24961.
- [7] Wong M, Kireeva ML, Kolesnikova TV, et al. Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate-early gene, regulates chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells[J]. Dev Biol, 1997, 192(2): 492-508.
- [8] Todorovic V, Chen CC, Hay N, et al. The matrix protein CCN1 (CYR61) induces apoptosis in fibroblasts[J]. J Cell Biol, 2005, 171(3): 559-568.
- [9] Lau LF. CCN1/CYR61: the very model of a modern matricellular protein[J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(19): 3149-3163.
- [10] Sánchez-Bailón MP, Calcabrini A, Mayoral-Varo V, et al. Cyr61 as mediator of Src signaling in triple negative breast cancer cells[J]. Oncotarget, 2015, 6(15): 13520-13538.
- [11] Jeong D, Heo S, Sung Ahn T, et al. Cyr61 expression is associated with prognosis in patients with colorectal cancer[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 164.
- [12] Cheng G, Zhang HY, Zhang LM, et al. Cyr61 promotes growth of glioblastoma in vitro and in vivo[J]. Tumour Biol, 2015, 36(4): 2869-2873.
- [13] Pilarsky CP, Schmidt U, Eissrich C, et al. Expression of the extracellular matrix signaling molecule Cyr61 is downregulated in prostate cancer[J]. Prostate, 1998, 36(2): 85-91.
- [14] Tong XJ, O'Kelly J, Xie D, et al. Cyr61 suppresses the growth of non-small-cell lung cancer cells via the β -catenin-c-myc-p53 pathway[J]. Oncogene, 2004, 23(28): 4847-4855.
- [15] Gellhaus A, Schmidt M, Dunk C, et al. The circulating proangiogenic factors CYR61(CCN1) and NOV(CCN3) are significantly decreased in placenta and sera of preeclamptic patients[J]. Reprod Sci, 2007, 14(8 Suppl): 46-52.
- [16] Mosa OF, Skitek M, Kalisnik JM, et al. Evaluation of serum cysteine-rich protein 61 and cystatin C levels for assessment of acute kidney injury after cardiac surgery[J]. Ren Fail, 2016, 38(5): 699-705.
- [17] Klingenberg R, Aghlmandi S, Liebetrau C, et al. Cysteine-rich angiogenic inducer 61(Cyr61): a novel soluble biomarker of acute myocardial injury improves risk stratification after acute coronary syndromes[J]. Eur Heart J, 2017, 38(47): 3493-3502.
- [18] Song YF, Xu ZB, Zhu XJ, et al. Serum Cyr61 as a potential biomarker for diagnosis of colorectal cancer[J]. Clin Transl Oncol, 2017, 19(4): 519-524.
- [19] Niu CC, Zhao C, Yang Z, et al. Inhibiting CCN1 blocks AML cell growth by disrupting the MEK/ERK pathway[J]. Cancer Cell Int, 2014, 14: 74.

(责任编辑:周一青)