

• 论 著 •

节律基因在慢性粒细胞白血病中表达水平及意义*

孙成铭¹, 冯文莉², 寇新明¹, 姜波¹, 李少君¹, 刘日明¹, 赵琪¹

(1. 青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院检验中心, 山东青岛 264000; 2. 重庆医科大学血液学教研室 400000)

摘要:目的 探讨节律基因在慢性粒细胞白血病(CML)中的表达情况,及其与 bcr/abl 融合基因的相关性,为临床治疗提供新的分子靶点。方法 收集 106 例 CML 患者慢性期、加速期、急变期的骨髓标本和 50 例健康体检人员的外周血为对照,采用 RT-PCR 法检测 per1、per2、bcr/abl 基因表达情况。结果 per1、per2、bcr/abl 基因在慢性期、加速期和急变期存在不同水平的变化,并且 per1、per2 表达水平与 bcr/abl 基因存在负相关。结论 节律基因作为肿瘤抑制因子在 CML 中是低表达的,在信号转导通路中是否与 bcr/abl 基因相互作用还需深入研究。

关键词:白血病,髓系,慢性,BCR-ABL 阳性; 白血病,髓样,加速期; bcr/abl 融合基因; 节律基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.013

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)03-0315-02

The significance and the expression level of circadian gene in the chronic myeloid leukemia*

Sun Chengming¹, Feng Wenli², Kou Xinming¹, Jiang Bo¹, Li Shaojun¹, Liu Riming¹, Zhao Qi¹

(1. The Affiliated Yantai Yuhuangding Hospital of Qingdao Medical University, Yantai 264000, China;

2. Department of Clinical Hematology, Chongqing Medical University, Chongqing 400000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression level of circadian gene in the chronic myeloid leukemia and the relationship of bcr/abl fusion gene, and provide the new molecular targets for the clinical treatment. **Methods** 106 cases of CML patients in chronic phase, accelerated phase, blast phase of bone marrow samples and 50 cases of normal peripheral blood were collected, the expression of per1, per2 and bcr/abl gene were detected by RT-PCR. **Results** per1, per2 and bcr/abl gene are different levels in chronic phase, accelerated phase and blast phase, and per1, per2 gene are negative correlation with bcr/abl gene. **Conclusion** circadian gene is low in the expression of CML as a tumor suppressor, further research will need to confirm whether the bcr/abl gene interact with circadian gene in signal transduction pathway.

Key words: chronic myeloid leukemia, myelogenous, chronic, BCR-ABL positive; leukemia, myeloid, accelerated phase; bcr/abl fusion gene; circadian gene

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是一种起源于造血干细胞的血液系统恶性疾病,其中 bcr/abl 融合基因的持续表达在该病的形成过程中起重要作用^[1]; BCR/ABL 融合蛋白在 CML 的慢性期和急变期存在不同水平的变化^[2-3];国外的研究表明^[4],节律基因 per2 作为一种肿瘤抑制基因在 CML 中存在部分甲基化,而在国内人群中其 mRNA 表达水平是否与 CML 急变有关尚缺乏研究,其与 bcr/abl 融合基因的上下游关系还不清楚,本组收取临床的 CML 患者标本进行这方面的研究,以期对 CML 的基因治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008 年 1 月至 2010 年 7 月来自本院门诊及住院的 106 例 CML 患者,其中男 65 例,女 51 例,根据患者的临床表现、血象、骨髓象、Ph 染色体、bcr/abl mRNA 等结果来

确定慢性期 CML 49 例、加速期 23 例、急变期 34 例。以 50 例健康体检人员作为健康对照组。

1.2 试剂 总 RNA 提取试剂盒、M-MLV 逆转录酶、Taq DNA 聚合酶由 Invitrogen 公司提供, per1、per2、bcr/abl、β-actin 引物由上海生工生物公司提供(N100628-6443),见表 1。

1.3 方法

1.3.1 mRNA 提取 将 2 mL 抗凝骨髓加入等体积 Hank's 液稀释,充分混匀;离心管中先加入淋巴细胞分离液 Ficoll 液,以 8 cm 离心半径,2 000 r/min 离心 20 min;吸取白细胞层至离心管中,用 Hank's 液洗涤 2 次,每次以 8 cm 离心半径,2 000 r/min 离心 5 min。收集骨髓单个核细胞,经 Trizol 试剂提取总 RNA,用紫外分光光度法测定 RNA 浓度。

表 1 RT-PCR 中合成的引物序列及预期产物长度

基因	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
β-actin(BC001301)	TAT GAC TTA GTT GCG TTA CAC CGC AAT GCT ATC ACC TCC C	360
per1(NM_002616.2)	TCC AAT CAG GAC GCA CTT TTG GAG CAC GTA CTT AAT CAC CTG GT	289
per2(NM_022817)	GCA GTA GCG ACC AGT CTT CCT CTT CAT TGG CTT TCA CC	176
bcr/abl	GCA GCT CCA CCT CAC CAA CTC AGA CCC TCA CGC TCA AAG TC	350

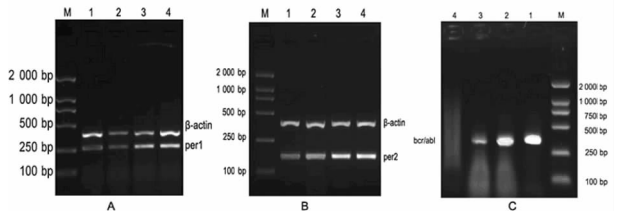
* 基金项目:烟台市科技发展计划项目(2008-142)。

1.3.2 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription PCR, RT-PCR)法检测基因表达 PCR 反应体系包括 4×dNTP(2.5 mM)2 μL, 10×buffer 4 μL, 上游引物(5 μM)2 μL, 下游引物(5 μM)2 μL, 反转录产物 4 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.4 μL, 加水至 40 μL。PCR 反应条件为 94 °C 3 min; 94 °C 35 s, 55 °C 55 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。取 PCR 产物 5 μL 上样于 1.6% 的琼脂糖凝胶中, 电压 80 V, 电泳 1 h。凝胶分析系统观察、分析。

1.4 统计学处理 试验结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, SAS8.2 软件进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

RT-PCR 结果表明, 在 CML 慢性期(CP)、加速期(AP)和急变期(BP), per1、per2 是逐渐下调表达, 各组光密度值 per1/β-actin 的平均比值分别为: BP 组 0.4 ± 0.05, AP 组 0.7 ± 0.08, CP 组 1.3 ± 0.14, 健康对照组 1.2 ± 0.15; 各组光密度值 per2/β-actin 的平均比值分别为: BP 组 0.5 ± 0.03, AP 组 0.6 ± 0.04, CP 组 1.1 ± 0.10, 健康对照组 1.3 ± 0.11。与健康对照组和 CP 组相比, AP 组和 BP 组光密度值具有统计学意义差异 ($P < 0.05$); 相反, bcr/abl 基因的表达逐渐增加(光密度值 BP 组 3.5 ± 0.31, AP 组 3.1 ± 0.25, CP 组 0.7 ± 0.07, 健康对照组 0.0), 与健康对照组和 CP 组相比, AP 组和 BP 组光密度值具有统计学意义差异 ($P < 0.05$)。说明 CML 急变与 bcr/abl 基因的过度表达有关, 见图 1。



注: M 为 DL2000 Marker; 1 为 BP 组; 2 为 AP 组; 3 为 CP 组; 4 为健康对照组; A 为 per1 基因表达电泳图; B 为 per2 基因表达电泳图; C 为 bcr/abl 基因表达电泳图。

图 1 RT-PCR 结果图

3 讨 论

CML 是一种造血干细胞的恶性克隆性增殖性疾病, 其特征性的 Ph 染色体所形成的 bcr/abl 融合基因编码 BCR/ABL 融合蛋白, 具有异常的酪氨酸激酶活性, 与 CML 的发病有关。该病病程可以从慢性期向急变期转变。目前, 针对酪氨酸激酶活性的抑制剂 STI-571 在临床得到广泛应用, 但随着治疗时间的延长, 其耐药性越来越显著^[5]。因此, 发现新的针对 bcr/abl 融合基因的小分子抑制剂及相关基因尤其重要^[6]。近期研究发现^[7-8], 许多肿瘤组织中都伴有不同程度的节律基因 per2 mRNA 或者蛋白水平的下调, 体外实验表明^[9-10], 过度表达 per2 和 per1 可以抑制肿瘤细胞的生长。本研究发现节律基因在 CML 中存在较低水平的表达, 在加速期和急变期尤其显著, 并且与 bcr/abl 融合基因的表达存在负相关。在 CML 患者中, per3 出现部分甲基化^[3], 在急变期和慢性期, per3 的下调与其甲基化有相关性, 而 per1、per2 部分甲基化, 同时存在低表达。有研究者报道^[11], 外源性 bcr/abl 融合基因的表达可

以抑制 per1、per2 的表达水平, 说明 BCR/ABL 融合蛋白的高水平表达抑制了节律基因的功能。这也可以在一定程度上解释 STI-571 的耐药性。在 bcr/abl 融合基因阳性的 CML 细胞中, per1、per2 究竟位于 bcr/abl 融合基因的上游还是下游, 还需进一步的探讨^[12]。当其在慢性期下调时, 会导致 BCR/ABL 酪氨酸激酶的活化, 患者会从慢性期进入急性期。体外诱导节律基因的表达是否可以缓解 CML 急变, 尚需深入研究。总之, 节律基因家族在抑制小鼠和人类癌症中的重要角色为进一步的研究提供了新的思路。

对于节律基因与白血病关系的研究一直是空白^[13]。有研究者通过分子和遗传学证据证实了节律基因在 CML 中的重要作用。研究节律基因与 CML 的关系将为人类治疗癌症提供新的策略。

参考文献

- [1] Calabretta B, Perrotti D. The biology of CML blast crisis[J]. Blood, 2004, 103(11): 4010-4022.
- [2] Ben-Neriah Y, Daley GQ, Baltimore D, et al. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene[J]. Science, 1986, 233(4760): 212-216.
- [3] 张文萍, 韩红星, 杨燕, 等. 建立 BCR-ABL 逆转录病毒介导的小鼠慢性粒细胞白血病模型的实验条件优化[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 526-528.
- [4] Yang MY, Chang JG, Lin PM, et al. Downregulation of circadian clock genes in chronic myeloid leukemia; alternative methylation pattern of hPER3[J]. Cancer Sci, 2006, 97(12): 1298-1307.
- [5] Pegg K, Mackinnon S. Imatinib mesylate-the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia[J]. N Engl J Med, 2003, 348(11): 1048-1050.
- [6] 刘璐, 刘北忠. 白血病分子标志物的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(2): 133-135.
- [7] Mostafaie N, Kállay E, Sauerzapf E, et al. Correlated downregulation of estrogen receptor beta and the circadian clock gene Per1 in human colorectal cancer[J]. Mol Carcinog, 2009, 48(7): 642-647.
- [8] Tokunaga H, Takebayashi Y, Utsunomiya H, et al. Clinicopathological significance of circadian rhythm-related gene expression levels in patients with epithelial ovarian cancer[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2008, 87(10): 1060-1070.
- [9] Winter SL, Bosnoyan-Collins L, Pinnaduwa D, et al. Expression of the circadian clock genes Per1 and Per2 in sporadic and familial breast tumors[J]. Neoplasia, 2007, 9(10): 797-800.
- [10] Yang X, Wood PA, Oh EY, et al. Down regulation of circadian clock gene Period 2 accelerates breast cancer growth by altering its daily growth rhythm[J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 117(2): 423-431.
- [11] Wood PA, Yang X, Hrushesky WJ. Clock genes and cancer[J]. Integr Cancer Ther, 2009, 8(4): 303-308.
- [12] Albrecht U, Bordon A, Schmutz I, et al. The multiple facets of Per2[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2007, 72: 95-104.
- [13] Chen-Goodspeed M, Lee CC. Tumor suppression and circadian function[J]. J Biol Rhythms, 2007, 22(4): 291-298.