

急性髓细胞白血病 17 号染色体短臂杂合性缺失的研究^{*}

王忠英, 林 楨, 邓小燕, 吴晓蔓, 周 强 (广州医学院第二附属医院 510260)

【摘要】 目的 探讨 17 号染色体短臂(17p13.3)的杂合性缺失(LOH)在急性髓细胞白血病(AML)中的作用。**方法** 采用聚合酶链反应扩增、聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸银染色技术,研究 17p13.3 上的 D17S1866、D17S695、D17S849、D17S926、D17S643 微卫星位点的 LOH。**结果** 30 例 AML 患者中发生 LOH 的共有 17 例(56.7%)25 例次, D17S1866、D17S695、D17S849、D17S926、D17S643 位点 LOH 的发生率依次为 23.3%(7/30)、23.3%(7/30)、16.7%(5/30)、13.3%(4/30)和 6.7%(2/30)。其中 2 例同时在 D17S1866、D17S849 位点发生 LOH; 2 例同时在 D17S1866、D17S695 位点发生 LOH; 1 例同时在 D17S695、D17S849 位点发生 LOH; 1 例同时在 D17S695、D17S926 位点发生 LOH; 1 例同时在 D17S1866、D17S849、D17S643 位点发生 LOH。10 例健康对照者均未发生 LOH。**结论** 17p13.3 上 D17S1866、D17S695、D17S849、D17S926、D17S643 位点可检测到较高频率的 LOH,提示该区域的 LOH 可能在 AML 的发生中有一定作用。

【关键词】 杂合性缺失; 急性髓细胞白血病; 17 号染色体短臂

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.09.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)09-1025-02

Research on the lost of heterozygosity on 17p13.3 in acute myelogenous leukemia WANG Zhong-ying, LIN Zhen, DENG Xiao-yan, WU Xiao-man, ZHOU Qiang (The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, 510260, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of the lost of heterozygosity(LOH)on chromosome 17p13.3 in acute myelogenous leukemia(AML). **Methods** LOH at 5 microsatellite markers including D17S1866, D17S695, D17S849, D17S926, D17S643 was detected in 30 cases of AML by polymerase chain reaction amplification(PCR), polyacrylamide gel electrophoresis and silver dye. **Results** LOH at one or more markers was observed in 17 out of 30 informative cases (56.7%). The frequencies of LOH in 5 microsatellites, namely D17S1866, D17S695, D17S849, D17S926, D17S643 were 23.3%(7/30), 23.3%(7/30), 16.7%(5/30), 13.3%(4/30) and 6.7%(2/30) respectively. 2 cases had LOH at both D17S1866 and D17S849. Another 2 cases had LOH at both D17S1866 and D17S695. One case had LOH at both D17S695 and D17S849, and one case had LOH at both D17S695, D17S926. One case had LOH at D17S1866, D17S849 and D17S643. 10 cases from the control group had no LOH. **Conclusion** High occurrence frequency of LOH can be found at D17S1866, D17S695, D17S849, D17S926 and D17S643 on 17p13.3, suggesting that the LOH in these region may lead to AML.

【Key words】 loss of heterozygosity; acute myelogenous leukemia; chromosome 17

微卫星是广泛存在于原核及真核细胞基因组中的简单串联重复的 DNA 序列。微卫星与许多重要基因紧密连锁,具有高度多态性,是第 2 代遗传标记。在某些肿瘤中,高频率的微卫星不稳定性包括杂合性缺失(LOH),标志着附近很可能隐藏着与该肿瘤发生和发展密切相关的抑癌基因,因此选择合适的微卫星标记可以发现微小的基因缺失,帮助寻找和定位候选的抑癌基因,以进一步研究其在肿瘤发生中作用。目前研究显示,17 号染色体短臂(17p13.3)区域在许多实体肿瘤中均可以检测到较高的 LOH 发生率,表明该区域在肿瘤的发生和发展过程中有重要作用^[1],但目前国内外关于急性髓细胞白血病(AML)在这一区域 LOH 的研究报道甚少。因此,本实验选择位于 17p13.3 上的 5 个微卫星位点 D17S1866、D17S695、D17S849、D17S926、D17S643 进行 LOH 的研究,以探讨其在 AML 中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2008 年 3 月至 2010 年 6 月本院依据

《血液病诊断和治疗标准》^[2] 诊断的 30 例 AML 患者,其中男 16 例,女 14 例,年龄 15~72 岁,平均 45.0 岁。选取 10 例健康查体志愿者作为健康对照组。

1.2 仪器与试剂 聚合酶链反应仪和低温离心机均为德国艾本德股份公司产品,垂直电泳仪为美国 BIO-RAD 公司产品。试剂均购自上海生工生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标本制备 收集 AML 患者的骨髓或入院第一次外周血标本、收集健康对照组的外周血标本,同时刮取口腔黏膜细胞作为自身对照。采用酚-仿-醇抽提法提取骨髓及外周血标本的 DNA,口腔黏膜 DNA 的提取采用 TE 消化液 56℃ 消化 3 h 后加热至 100℃ 10 min,取其上清液。

1.3.2 引物合成 从 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 查出位点的引物序列,由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。

1.3.3 聚合酶链反应扩增 25 μL 反应体系中含有模板

* 基金项目:广州市医药卫生科技一般引导项目(2009-YB-158)。

DNA 0.25 ng, 4×dNTP 各 125 μmol/L, 引物各 10 pmol, Taq plus I DNA 聚合酶 1 U, 10×buffer(内含 Mg²⁺) 4 μL。PCR 基本反应程序为 95℃ 5 min 预变性后, 进行 35 个循环: 95℃

30 s, 55℃(引物更换时, 根据引物长度和碱基组成优化反应条件) 30 s, 72℃ 45 s, 之后 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。取 5 μL 扩增产物, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外光下观察扩增结果。

表 1 所选微卫星位点的引物序列、退火温度和产物长度

微卫星段点	引物序列	退火温度(℃)	产物长度(bp)
D17S1866	正向引物 TGGATTCTGTAGTCCCAGG	55	175
	反向引物 GGTTCAAAGACAACCTCCC		
D17S695	正向引物 CTGGGCAACAAGAGCAAAATTC	60	205
	反向引物 TTTGTTGTTGTTTCATTGACTTCAGTCT		
D17S849	正向引物 CAATTCTGTTCTAAGATTATTTTGG	55	253
	反向引物 CTCTGGCTGAGGAGGC		
D17S926	正向引物 GCAGTGGGCCATCATCA	58	253
	反向引物 CCGCAGAAGGCTGTTGT		
D17S643	正向引物 CTTCCTGTCTCTAAACAGTCCTTT	60	147
	反向引物 GTAGTCCCAGGGAGCTGGAAGT		

1.4 结果观察与分析 扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸银染色后, 用凝胶成像分析仪分析是否发生 LOH。首先判断样本在该卫星位点是否为有信息的(informative); 有信息是指正常组织来源的标本扩增产物经电泳银染后出现 2 条等位基因条带; 如果只有 1 条等位基因条带, 则该位点为非信息的, 无法判断其是否发生了 LOH。与患者自身正常组织比较, 若某一微卫星位点的等位基因条带消失或相对密度减少 50% 以上记为 LOH。

2 结 果

2.1 健康对照组在 D17S1866、D17S695、D17S849、D17S926、D17S643 位点发生 LOH 情况 健康对照组 10 例外周血细胞和口腔黏膜细胞 DNA 在 D17S1866、D17S695、D17S849、D17S926、D17S643 位点电泳条带完全相同, 均未发生 LOH。

2.2 AML 患者在 D17S1866、D17S695、D17S849、D17S926、D17S643 位点发生 LOH 情况 30 例 AML 患者皆为信息个体, 其中有 17 例 25 例次在 D17S1866、D17S695、D17S849、D17S926、D17S643 中的一个或多个位点发生 LOH, 占 56.7%, 其中有 7 例在 D17S1866 位点发生 LOH, 占 23.3%; 7 例在 D17S695 位点发生 LOH, 占 23.3%; 5 例在 D17S849 位点发生 LOH, 占 16.7%; 4 例在 D17S926 位点发生 LOH, 占 13.3%; 2 例在 D17S643 位点发生 LOH, 占 6.7%。其中 2 例同时在 D17S1866、D17S849 位点发生 LOH; 2 例同时在 D17S1866、D17S695 位点发生 LOH; 1 例同时在 D17S695、D17S849 位点发生 LOH; 1 例同时在 D17S695、D17S926 位点发生 LOH; 1 例同时在 D17S1866、D17S849、D17S643 位点发生 LOH。

3 讨 论

人类 17 号染色体与许多肿瘤的发生和发展有着密切的关系。越来越多的证据表明, 人类染色体 17p13.3 区与恶性肿瘤的发病有密切的关系, 而且此区带发生 LOH 时并不伴随 p53 基因的突变, 提示 17p13.3 区带可能存在尚未被发现的新抑癌基因^[3-5]。赵新泰等^[6]选用 YNZ22 位点两侧的多个多态性标志进行原发性肝癌染色体 17p13.3 区的精细 LOH 分析, 确定了肝癌在该区的缺失范围和最小热点缺失范围, 并利用一些多

态性标志和微卫星标志进行了基因组克隆的筛选, 构建了该区的连续克隆群(contig), 为进一步的基因克隆打下了基础。

目前国内外学者对于该区域缺失的研究主要集中在实体瘤上, 对于恶性血液病在 17p13.3 的 LOH 和新抑癌基因的定位和克隆研究甚少。Sankar 等^[7]检测了 17 例髓系白血病和 7 例淋巴系白血病/淋巴瘤患者, 结果表明, 80%(19/24) 的患者在 17p13.3 上的 cC17-624 位点有等位基因的缺失。他们推测在该区含有新的抑癌基因, 且与白血病的发生有关。作者对 37 例慢性粒细胞白血病患者 17p13 的 TP53 和 AFMa127xg9 2 个微卫星位点 LOH 的检测结果表明, AFMa127xg9 位点 LOH 发生率为 29.7%^[8], 明显高于 TP53 位点 LOH 发生率(10.8%)。AFMa127xg9 位点在 p53 基因的端粒侧, AFMa127xg9 位点附近可能存在与 AML 发生和发展有关的新抑癌基因。Stocklein 等^[9]对弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的研究证明在 17p 上 TP53 位点端粒侧约 0.8 MB 的区域有一最小缺失区, 提示该区域存在是与弥漫性大 B 细胞淋巴瘤发病有关的新抑癌基因。

本研究在现有的对实体肿瘤和部分恶性血液病染色体 17p13.3 LOH 研究的基础上, 有针对性地选择微卫星位点, 利用微卫星标记方法, 对 AML 染色体 17p13.3 区域进行微卫星 LOH 的检测, 以确定 AML 在该区的缺失范围。本研究中所选的 5 个微卫星位点分布在染色体 17p13.3 上约 750 kbp 的范围内, 按照从端粒到着丝粒的方向依次是 D17S1866、D17S643、D17S849、D17S926、D17S695。研究结果显示, 本组 30 例 AML 病例中 56.7% 的病例在以上 5 个位点中的一个或多个位点发生 LOH, 发生率较高, 与作者对 37 例慢性粒细胞白血病患者 AFMa127xg9 位点的检测结果相近, 进一步表明在 p53 基因的端粒侧可能存在与白血病发生和发展有关的新抑癌基因^[4]。其中在 D17S1866 和 D17S695 位点 LOH 发生率最高, 为 23.3%(7/30), 提示可能该位点附近的基因事件参与了 AML 的发生。本文将在这 2 个位点附近选取更多更精细的微卫星位点进行深入研究, 以探讨该区域的缺失在 AML 发生和发展过程中的作用。 (下转第 1029 页)

TORCH 感染在围生医学中称为 TORCH 综合征,呈世界性分布,发病率很高^[12],且孕妇是 TORCH 病原体的易感人群。本文中 2 813 例妊娠妇女的 TORCH-IgM 总阳性率(11.13%)显著高于 600 例育龄妇女的总阳性率(6.50%),同时高于相关文献报道中妊娠妇女的总阳性率^[4],提示孕妇 TORCH 感染呈逐年上升的趋势,应引起各级医疗卫生部门的重视,加强 TORCH 感染的预防诊治工作。本研究结果还显示,不良妊娠妇女所有 TORCH 项目的 IgM 阳性率均明显高于健康妊娠妇女,差异均有统计学意义($P < 0.05$),胎儿畸形率、流产、早产率及胎儿宫内发育迟缓显著增高,进一步表明 TORCH 系列病原体与胚胎和胎儿发育的密切关系。另外 TORCH 感染受到季节影响明显,春、夏季 TORCH-IgM 总阳性率和 TOX、CMV、HSV I 及 HSV II 的 IgM 阳性率明显高于秋、冬季,而 RUV-IgM 阳性率冬、春季显著高于夏、秋季。

TORCH 感染是引起胎儿宫内感染及新生儿缺陷的重要原因,我国是胎儿先天畸形或缺陷发生率较高的国家之一, TORCH 综合征对胎婴儿的严重危害应受到妇产科、妇幼保健、计划生育等有关部门的高度重视。育龄妇女进行 TORCH 感染常规筛查,无活动感染时受孕可降低宫内感染的风险。怀孕后在不同时期进行复查,及早发现不良妊娠,对感染者除给予必要的药物治疗外,应密切观察胎儿发育情况,发现异常应及时终止妊娠。由于目前对 TORCH 病原体感染的治疗还没有统一的方法,因而提倡以预防为主,广泛宣传 TORCH 感染的危害,尤其要加强对孕妇的宣传教育和连续监测,保证出生婴儿健康成长,从而达到提高人口素质的目的。

参考文献

[1] Taechowisan T, Sutthent R, Louisirirothanakul S, et al. Immune status in congenital infections by TORCH agents

in pregnant Thais [J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 1997, 15(2): 93-97.

[2] 闻良珍. TORCH 感染与出生缺陷[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2008, 24(2): 110-113.

[3] 郑林儿, 范骏. 自然流产与 TORCH 感染相关性分析[J]. 检验医学, 2005, 20(2): 115.

[4] 丁华, 刘和录, 韩杰辉, 等. 7 650 例孕妇血清 TORCH 检测结果分析[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(10): 1447-1448.

[5] 张杰, 林小兰, 梁晓萍, 等. 深圳市育龄妇女 TORCH 感染调查分析[J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(34): 4868-4869.

[6] 李军, 史海龙, 刘继池. 山东省 9 928 例育龄妇女孕前 TORCH 筛查结果分析[J]. 中国优生优育, 2009, 15(4): 216-218.

[7] 严仁英. 实用优生学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 334-341.

[8] 肖征, 周光, 胡琳琳. TORCH 抗体检测及对优生优育的指导作用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2009, 17(12): 28-30.

[9] 王丽波, 李木子. 124 例孕妇 TORCH 检测结果分析[J]. 浙江临床医学, 2008, 10(10): 1335-1336.

[10] Gerber S, Hohlfield P. Screening for infection diseases[J]. Child Nerv Syst, 2003, 19(8): 429-432.

[11] 崔满华. 妇产科感染性疾病规范诊疗手册[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007: 164-165.

[12] 胡边, 殷学军. 孕妇 TORCH 感染与生殖健康的研究现状[J]. 中国优生与遗传杂志, 2001, 9(6): 124-125.

(收稿日期: 2010-12-02)

(上接第 1026 页)

参考文献

[1] Hoff C, Seranski P, Mollenhauer J, et al. Physical and transcriptional mapping of the 17p13.3 region that is frequently deleted in human cancer[J]. Genomics, 2000, 70: 26-33.

[2] 张之南. 血液病诊断和治疗标准[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998: 168-185.

[3] Czuchlewski DR, Andrews J, Madden R, et al. Acute Lymphoblastic leukemia in a patient with Miller-Dieker syndrome[J]. J Pediatric Hematol/Oncol, 2008, 30(11): 865-868.

[4] Jenal M, Britschgi C, Fey MF, et al. Inactivation of the hypermethylated in cancer I tumour suppressor-not just a question of promoter hypermethylation[J]. Swiss Med Weekly, 2010, 140: 13106-13114.

[5] Woo HI, Kim HJ, Lee SH, et al. Acute myeloid leukemia with complex hypodiploidy and loss of heterozygosity of

17p in a boy with Fanconi anemia[J]. Ann Clin Laboratory Sci, 2011, 41(1): 66-70.

[6] 赵新泰, 万大方, 蒋惠秋, 等. 肝癌染色体 17p13.3 区的杂合性缺失分析及缺失区连续克隆群的构建[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(5): 377-380.

[7] Sankar M, Tanaka K, Kumaravel TS, et al. Identification of a commonly deleted region at 17p13.3 in leukemia and lymphoma associated with 17p abnormality [J]. Leukemia, 1998, 12(4): 510-516.

[8] 吴春梅, 卢伟, 王忠英. 慢性粒细胞白血病微卫星不稳定性检测及其意义[J]. 青岛大学医学院学报, 2006, 42(3): 214-216.

[9] Stocklein H, Smardova J, Macak J, et al. Detailed mapping of chromosome 17p deletions reveals HIC1 as a novel tumor suppressor gene candidate telomeric to TP53 in diffuse large B-cell lymphoma[J]. Oncogene, 2008, 27(18): 2613-2625.

(收稿日期: 2010-12-01)