

反映抗体、TGF-β 和 nTreg 表达变化的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(6): 831-834.

[4] Rasti Z, Nasiri M. Association of the +49 a/G polymorphism of CTLA4 gene with idiopathic recurrent spontaneous abortion in women in southwest of Iran[J]. J Reprod Infertil, 2016, 17(3): 151-156.

[5] Shahsavari S, Noormohammadi Z, Zare KS. Association of kinase insert domain-containing receptor(KDR) gene polymorphism/haplotypes with recurrent spontaneous abortion and genetic structure [J]. Int J Reprod Biomed (Yazd), 2015, 13(12): 755-764.

[6] Samimi M, Foroozanfard F, Amini F, et al. Effect of vitamin D supplementation on unexplained recurrent spontaneous abortion; a Double-Blind randomized controlled trial [J]. Glob J Health Sci, 2016, 9(3): 95.

[7] 鲍粉红, 赵可宁. 封闭抗体不足性反复自然流产治疗研究[J]. 长春中医药大学学报, 2012, 28(5): 831-833.

[8] Dhillon PK, Khalafallah AA, Adams MJ. Changes to fibrinolysis in patients with systemic lupus erythematosus are associated with endothelial cell damage and inflammation, but not antiphospholipid antibodies[J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2016, 27(8): 870-875.

[9] 孙朋, 董雪梅, 杜晓钟, 等. 反复自然流产患者检测抗心磷脂抗体及 IgA 抗 β2-GP I 的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(2): 134-135.

[10] 徐传花, 种丽群. 益肾清热法治疗反复自然流产抗心磷脂抗体阳性临床观察[J]. 吉林中医药, 2011, 31(9): 856-857.

[11] 陈柳青, 连炬飞, 曾丽, 等. 探讨 BA, EMAB 及 ACA 与不明原因复发性自然流产的相关性[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(4): 137-140.

[12] 李素萍, 金玉霞, 苗正友. 不明原因反复自然流产患者的抗生殖免疫抗体分析[J]. 中国现代医生, 2011, 49(10): 134-135.

[13] 龙驭云. 反复自然流产患者血清 ThAb、AsAb、EMAb 和 AoAb 检测的临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2012, 25(6): 606-608.

[14] 陈秀莲, 何明娟, 吴春红, 等. 封闭抗体、抗子宫内膜抗体在反复自然流产中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(7): 813-814.

[15] 周俊彦. 育龄期夫妇中抗精子抗体和抗子宫内膜抗体的阳性表达及其相关因素分析[J]. 中国男科学杂志, 2011, 25(7): 32-37.

• 临床探讨 •

脂抗体及 IgA 抗 β2-GP I 的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(2): 134-135.

[10] 徐传花, 种丽群. 益肾清热法治疗反复自然流产抗心磷脂抗体阳性临床观察[J]. 吉林中医药, 2011, 31(9): 856-857.

[11] 陈柳青, 连炬飞, 曾丽, 等. 探讨 BA, EMAB 及 ACA 与不明原因复发性自然流产的相关性[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(4): 137-140.

[12] 李素萍, 金玉霞, 苗正友. 不明原因反复自然流产患者的抗生殖免疫抗体分析[J]. 中国现代医生, 2011, 49(10): 134-135.

[13] 龙驭云. 反复自然流产患者血清 ThAb、AsAb、EMAb 和 AoAb 检测的临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2012, 25(6): 606-608.

[14] 陈秀莲, 何明娟, 吴春红, 等. 封闭抗体、抗子宫内膜抗体在反复自然流产中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(7): 813-814.

[15] 周俊彦. 育龄期夫妇中抗精子抗体和抗子宫内膜抗体的阳性表达及其相关因素分析[J]. 中国男科学杂志, 2011, 25(7): 32-37.

(收稿日期: 2017-02-11 修回日期: 2017-04-20)

儿童急性淋巴细胞性白血病 Bmal1、eIF4E 基因表达及临床意义

陈立刚

(海南省人民医院检验科, 海口 570001)

摘要:目的 探讨儿童急性淋巴细胞性白血病(ALL)外周血 Bmal1、eIF4E 基因表达及临床意义。方法 选取 2011 年 7 月至 2014 年 12 月该院收治的 ALL 患儿 80 例作为研究对象, 分为初诊组与缓解组, 另选取同期健康体检儿童 40 例为对照组, 对比各组 Bmal1、eIF4E 基因表达情况。结果 初诊组外周血 Bmal1 基因表达水平依次高于缓解组、对照组, 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 初诊组 eIF4E 基因表达水平依次高于缓解组与对照组, 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 儿童外周血 ALL Bmal1、eIF4E 基因表达异常, 可作为临床诊疗指标。

关键词:急性淋巴细胞白血病; Bmal1 基因; eIF4E 基因; 化疗

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.20.042 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)20-3085-03

急性淋巴细胞白血病(ALL)属于恶性血液系统肿瘤疾病, 多发于我国儿童群体, ALL 发病率占儿童白血病 70% 以上, 主要是指因造血干细胞增殖分化存在异常导致淋巴细胞分化阻滞, 于儿童阶段发生的恶性克隆性疾病^[1]。ALL 病因及机制尚未完全明确, 已有研究指出 ALL 与基因激活、抑癌基因失活、细胞凋亡等因素存在关联, 但目前尚未完全调查、阐述明确^[2]。目前临床治疗 ALL 多采用序贯化疗法进行, 且缓解率可达 90%, 但仍存在大量临床病理结果显示 ALL 长期存活率较低, 并存在部分复发情况^[3]。ALL 对患儿健康造成严重威胁, 长期实施化疗干预存在相应不良反应, 加大患儿身心痛苦, 因此临床正加强探索 ALL 发病机制及新型治疗手段, 目前提高药物治疗效果、减少化疗不良反应是国内外学者研究的重难点^[4]。有研究指出, 多种基因在癌症疾病发生及复发中存在一

定作用, 但目前尚未出现详细报道^[5]。本研究主要针对儿童 ALL 外周血 Bmal1 及 eIF4E 基因表达与临床意义进行探讨, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 7 月至 2014 年 12 月本院收治的 ALL 患儿 80 例作为研究对象, 其中男 44 例、女 36 例, 年龄 1~12 岁、平均(6.01±0.23)岁, 根据其治疗情况分为初诊组(未接受化疗干预)与缓解组(经骨髓形态细胞学检查结果显示, 原始淋巴细胞及幼稚淋巴细胞占比<5%, 符合骨髓完全缓解标准), 每组 40 例。ALL 患儿均排除心血管疾病、肿瘤、近期药物治疗、睡眠周期紊乱等影响本研究基因表达疾病患者。另选取同期于本院接受健康体检的儿童 40 例为对照组, 其中男 20 例, 女 20 例, 年龄为 1~12 岁, 平均(5.97±0.21)岁。两

组患儿一般资料比较差异无统计学意义($P < 0.05$),具有可比性。

1.2 方法 (1)标本收集:本研究所有研究对象均于晨起 6 时左右应用无菌注射器抽取肘部静脉血 2 mL,快速注射至无菌抗凝管内(含乙二胺血酸),轻轻摇晃均匀。(2)外周血核细胞分离:将新鲜外周血标本按照 1:1 比例与无菌生理盐水进行稀释。按照外周血稀释液与淋巴细胞分离液按照 1:1 比例借助无菌吸管沿管壁将外周血稀释液缓缓滴入淋巴细胞分离液内。于 $400 \times g$ 、 20°C 条件下离心,20 min,待管内溶液逐步分为 4 层后方可应用无菌加样枪吸取中间白膜层。白膜层吸取后放置于 RNase-Free 离心管内(管内含 3 mL 生理盐水),充分混合均匀。再次在 $400 \times g$ 、 20°C 条件下离心 20 min,直至得到白色沉淀。弃去上清液,用无菌生理盐水对白色沉淀进行反复清洗,制成细胞悬液,放入 1.5 mL RNase-Free 离心管再次离心弃上清,最终所得白色沉淀即外周血单个细胞核。(3)总 DNA 提取:于 RNase-Free 离心管内(管内放置外周血单个细胞核)加入 Trizol 1 mL,借助加样枪吹打数次。于室温条件下静置 5 min,确保蛋白核酸完全分离。加入三氯甲烷 200 μL ,用微量加样枪吹打混合均匀,将离心管盖盖好后剧烈震荡 15 s 后放置于室温条件下静置 5 min。经 4°C 、 $12\ 000 \times g$ 离心 15 min。用 RNase-Free 微量加样枪将 3 层水相内上内无色水相吸取转放于另 1 个空 RNase-Free 离心管(1.5 mL)内。于离心管内加入等量异丙醇,混合均匀后静置 10 min,经 4°C $12\ 000 \times g$ 离心 5 min,上清液弃去放置 3 min 使其自然晾干,后加入 20 μL 焦碳酸乙酯水,确保 RNA 溶解,经水平测定,选取部分 RNA 反转录合成 cDNA。(4)转录合成 cDNA:冰浴状态下于 1.5 mL EP 管(无 RAase)内加入 3 μL RNA、1 μL RNase-Free Water、1 μL Loligo(dT)18 primer,轻轻摇晃均匀后放置于 70°C 下温浴 5 min。温浴结束后立刻冰浴 5 min,并在上述反应体系内依次加入 6 μL LRNase-Free Water、4 μL GoScriptTM 5X Rreaction Buffer、1 μL RiboLockTM RNase Inhibitor、1 μL 10 mol/L dNTP Mix、2 μL MgCl_2 (终水平 1.5~5.0 mol/L)、1 μL GoScriptTM Reverse Transcriptase,混合均匀后放置于 42°C 条件下温浴 1 h。再次放置于 70°C 条件下水浴 15 min,灭活反转录酶,反应终止后即可得到 cDNA,放置于 -80°C 条件下,留作备用。(5)Bmal1、eIF4E 基因表达测定:分别从美国国立生物技术信息中心数据库内查找 Bmal1、eIF4E 基因序列,反映体系均参照反转录试剂盒相关说明书进行操作,退火温度设置为 60°C ,延伸式进行荧光信号测定。基因表达量计算:同一样品(目的基因拷贝值/ABL 拷贝值) $\times 10^4$,计算 Bmal1、eIF4E 基因表达水平,将各标本间 mRNA 水平差异消除。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件分析处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;以 $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 三组研究对象外周血 Bmal1、eIF4E 基因表达对比 初诊组 Bmal1、eIF4E 基因表达水平高于对照组,比较差异有统计学意义($t = 13.56$ 、 119.97 , $P < 0.05$);缓解组 Bmal1、eIF4E 基因表达水平明显高于对照组,差异有统计学意义($t = 47.970$ 、 85.125 , $P < 0.05$);初诊组 Bmal1、eIF4E 基因表达高

于缓解组,差异有统计学意义($t = 21.982$ 、 57.892 , $P < 0.05$),见表 1。

表 1 三组研究对象外周血 Bmal1、eIF4E 基因表达对比($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Bmal1	eIF4E
初诊组	40	10.38 \pm 2.11	49.03 \pm 6.51
缓解组	40	9.06 \pm 1.21	27.46 \pm 3.23
对照组	40	7.76 \pm 0.89	10.87 \pm 1.48

3 讨 论

有学者研究指出,ALL 发病与多种基因表达及调控存在关联^[6]。eIF4E 基因属于蛋白质翻译限速因子,该因子表达过量时可促进细胞增殖及生长抑制细胞凋亡,最终形成细胞癌变。另有研究报道指出,多种类型肿瘤细胞内 eIF4E 基因均存在高表达水平,与肿瘤发生及转移存在密切关联^[7]。流行病学研究结果显示,昼夜节律与癌症易感性存在关联,有学者提出肿瘤发生于昼夜节律相关控制基因产生变化存在关联的假设,并逐步在后续研究中得到证实^[8]。其中 Bmal1 基因属于节律核心基因,对维持及产生昼夜节律震荡起重要作用。目前关于生物钟基因表达节律紊乱及突变导致昼夜节律调控相关细胞进程紊乱,发生肿瘤性疾病等类型研究在 ALL 疾病表达中研究的报道较少^[9]。

本研究结果显示,eIF4E 基因表达水平最高为初诊组,依次为缓解组与对照组。提示初诊组 eIF4E 基因表达明显高于缓解组及对照组,其原因主要为 eIF4E 基因属于蛋白质翻译限速因子,不会直接参与癌细胞形成,研究对象 ALL 患儿发病初期及初次诊治时检查该基因表达可对化疗方案选择及预后效果判断等提供依据,意义重大。赵月华等^[10]研究发现,慢性粒细胞白血病患儿外周血白细胞内 Bmal1 基因表达水平较对照组明显升高,因此将 Bmal1 基因作为肿瘤疾病发生中的抑癌基因。本研究显示,初诊组 Bmal1 基因表达水平最高,其次为缓解组,对照组最低。提示,Bmal1 基因水平升高可能与儿童出现 ALL 症状及接受化疗存在关联。有学者针对 ALL 患儿 Bmal1 基因水平进行研究中发现,66% 患儿 Bmal1 基因表达水平处于正常状态,其余患儿存在 Bmal1 基因 cpG 岛甲基化现象,提出可能部分患儿 Bmal1 基因表达升高与 ALL 存在关联^[11]。另有研究指出,ALL 初诊患儿 Bmal1 基因表达较高与 Bmal1 表达节律改变有关,导致同一时间节点内测得的患儿 Bmal1 表达水平与对照组存在差异^[12]。本研究结果提示,缓解组 Bmal1 表达水平低于初诊组,可能与患儿接受化疗治疗存在关联。因 Bmal1 基因属于生物钟基因,会受外界温度、血清激素、饮食、糖皮质激素等方面影响。有报道称,生物体内存在多种信号均可对其生物钟基因表达产生影响,研究较多的为钙离子维甲酸受体、糖皮质激素受体对激酶 MAP、激酶 A、激酶 C 活化等化学物质的影响^[13]。张丽等^[14]研究指出,针对 AML 患儿与对照组 Bmal1 基因研究时发现二者表达节律产生改变,患儿 Bmal1 基因低于对照组,经治疗后基因表达逐渐恢复。

综上所述,ALL 患儿外周血存在 Bmal1、eIF4E 基因表达异常,提示 Bmal1、eIF4E 基因可作为 ALL 诊疗评估指标。但