

基因分析在急性白血病分型中的应用的基础研究

朱元晓 赖春宁 白 炎 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘 要

本文应用分子杂交技术, 从 DNA 和 RNA 水平探讨了一些细胞谱性相关基因在急性白血病分型中应用的可能性及意义. 研究系统分析了免疫球蛋白重链 (JH) 和 T 细胞抗原受体 β 链 (T β) 基因重排以及 T β , CD_{3 ϵ} 和髓过氧化物酶 (MPO) 基因 mRNA 产物与各型急性白血病的相互关系. 结果表明, 上述各基因的重排或表达均是和急性白血病细胞谱系相关的早期标志. 将基因分析应用于临床急性白血病分型将可弥补现有分型手段的不足, 提高急性白血病分型的精确性.

关键词 基因、重排、表达、白血病、分型

白血病是我国九大肿瘤之一, 它是各系造血细胞在不同分化阶段的异常克隆性增生. 根据白血病肿瘤细胞的谱系和分化水平对急性白血病进行分型, 对指导该病的临床治疗和预后分析具有重要意义. 目前国内采用的白血病分型手段主要包括形态学、组织化学检测和免疫表型分析, 这些分型手段虽可区分大多数病例的细胞谱系和分化水平, 但却不能识别那些起源于分化早期, 缺乏典型特征的肿瘤细胞的来源. 此外, 通过免疫表型分析, 临床上发现一些双表型和杂合型白血病. 由于缺乏进一步的分析手段, 对此类白血病仍缺乏深入的认识和有效的治疗措施.

基因分析手段近年来被用于多种疾病的诊断中, 已显示出明显的优势. 除这项技术本身具有的高特异性、高敏感性特点外, 由于基因水平的改变通常出现于细胞增殖分化的早期, 因而基因分析技术可弥补常规方法的不足, 提高早期诊断的精确性. 在急性白血病分型中, 近年来对细胞谱系相关基因的分析检测, 已成为急性白血病分型的又一重要参数. 本研究在对急性白血病进行形态、组化和免疫表型分析的基础上, 进一步从 DNA 和 RNA 水平上探讨了一些细胞源性相关基因检测在急性白血病分型中应用的可能性及意义.

1 材 料 与 方 法

1.1 病例选择及样本制备

取自初发或复发化疗前患者经肝素抗凝的骨髓, 样本中幼稚细胞应大于 50%, 经单核细胞

分离液(比重 1.077)分离出单个核细胞,用 PBS 制成单细胞悬液. 对照组正常人骨髓样本按相同方法制备. 实验中所用的白血病细胞株均由国外惠赠,培养收集后,用 PBS 制成悬液.

1.2 形态、组化分析

按常规进行,由临床血液室完成.

1.3 免疫表型分析

采用免疫荧光测定或/和碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶桥联酶标组化染色,用于分型的单克隆抗体和分型结果判断按国际通用标准^[1].

1.4 免疫球蛋白和 T 细胞抗原受体基因重排分析

采用 Southern 印迹杂交方法. 首先用常规方法提取待检样本的 DNA,将其分别用 EcoRI, BamH I, Hind III 消化,经 0.7% 琼脂糖胶电泳分离,再用低吸印将 DNA 从胶内转移到硝酸纤维素膜上,然后与 ³²P 标记的免疫球蛋白重链(JH)和 T 细胞抗原受体 β 链(T β)基因探针杂交,放射自显影. 当 EcoR I 消化时,胚系 JH 基因的大小为 16kb;当 BamHI 消化时,胚系 T β 基因大小为 22.4kb,若出现不同于胚系基因大小的条带或条带缺失,表明 JH 或 T β 基因发生重排^[2,3].

1.5 T β 基因、CD₃ ϵ 基因、MPO 基因转录产物的分析

用 AGPC 法提取被检样本总 RNA^[4],然后用 Northern 印迹杂交或狭缝印迹杂交法检测各样本的 T β CD₃ ϵ 或 MPO 基因表达,为确证狭缝印迹分析中各样本 RNA 的活性及取样量,每份样本 RNA 同时与 β -actin 探针杂交.

2 结 果 与 讨 论

2.1 急性白血病免疫球蛋白和 T 细胞抗原受体基因重排的分析研究

免疫球蛋白(Ig)和 T 细胞抗原受体(TCR)是 B、T 淋巴细胞识别抗原的功能集团,编码 Ig 和 TCR 分子各链的基因,由相似的 V、(D)、J、C 片段区构成,这些基因片段在淋巴细胞分化过程中由原来散在分布的胚系状态重排为能够转录和表达的活性基因. 国外的研究结果证明,白血病细胞中 Ig 和 TCR 分子各链基因的重排状况不同程度地反映了白血病细胞的谱系和分化水平^[5,6]. 本研究主要探讨了 Ig 重链 J 区(JH)和 TCR 分子 β 链(T β)基因重排分析在急性分型中的意义.

首先分析了白血病细胞株和正常组骨髓样本的 JH 和 T β 基因重排状况. 结果显示,5 株 T 系白血病细胞株中(JM₁, GH, Jurket, HPB-ALL, HBS-2)均有 T β 基因重排,而 JH 基因为胚系状态. 与此相反,3 株 B 细胞株中(Raji, Bri-8, Nalm-1)有 JH 基因重排,T β 基因为胚系基因. 正常人骨髓样本的 T β 和 JH 基因均显示胚系状态,说明正常多克隆淋巴细胞中重排基因位点不同,因而不足以被检测出来. 急性白血病病例的样本,按其形态、组织化学和表型特征被分为三组,即:T 表型急淋(T-ALL)、非 T 表型急淋(非 T-ALL)和急非淋(ANLL). JH 和 T β 基因在这三组病例中的重排机率如表 1 所示. 部分图象见图 1. 本研究所得结果与白种人白血病

表 1 各型急性白血病的基因重排机率

类 型	T β 基因重排	JH 基因重排
T-ALL	33/37	3/32
非 T-ALL	7/32	30/30
ANLL	1/17	3/17

的分析结果类似, JH 和 T β 基因分别在约 90% 的非 T-ALL 和 T-ALL 中重排, 表明 JH 和 T β 基因重排分别是 B、T 源性白血病的重要特征。由于 T β 和 JH 基因在少数 ALL 和 ANLL 中存在非特异交叉重排现象, 提示它们可作为细胞谱系分析的相关参数, 而不是绝对标志。

T β 和 JH 基因在细胞分化过程中的重排阶段, 决定了它们是否作为细胞谱系的早期标志。根据淋巴细胞分化过程中表型标志的变化规律, 将各分化阶段表型的病例依次排列后发现, T β 基因重排始于 T 细胞发育的第 1 阶段, 约在 CD₇ 抗原出现之后, CD₅, CD₂ 抗原出现之前或同时。JH 基因重排亦发生于 B 细胞分化的极早期, 约在 DR 抗原出现之后和 CD₁₉ 抗原表达之前。CD₇ 抗原和 DR 抗原在一些髓系急性白血病病例中也可显示阳性, 因而对这类病例辅以基因重排分析, 有助于提高分型的精确率。本研究从 10 例仅表达 DR 抗原的病例中, 检出 9 例有 JH 基因重排, 提示这些病例为分化及早期的前 B 细胞白血病。基因重排还可能及早地反映一些肿瘤细胞的分化趋向, 例如我们在 4 例 CD₃₄ 阳性的未分化型白血病中, 检测到 2 例有 JH 或/和 T β 基因重排。

本研究还分析了 5 例具有 T、B 标志的双表型 ALL 和具有淋粒标志的杂合型急性白血病。此类白血病约占急性白血病的 0.6%, 它们可能反应了造血细胞在分化早期的多向分化性和不稳定性, 临床对此类白血病尚缺乏深入的认识。我们的研究结果显示, 3 例 T、B 双表型 (CD₂⁺, CD₁₉⁺) 的样本中, 2 例有 JH 基因重排, 1 例有 JH 和 T β 基因重排。2 例淋、粒杂合型 (CD₁₉⁺, CD₃₃⁺) 的白血病中, T β 和 JH 基因均为胚系构型 (见表 2)。上述结果提示, 2 例仅有 JH 基因重排的 T、B 双表型病例细胞主要向 B 谱系方向分化, 而 T β 和 JH 基因均为胚系的淋粒杂合型白血病细胞则偏向于粒系方向。虽然目前尚无基因型与白血病治疗和预后关系的报道, 但这仍然是值得研究的领域。

表 2 5 例杂合型急性白血病的免疫表型及基因型^{a)}

序 号	MPO	免 疫 表 型							基 因 型	
		TdT	CD ₇	CD ₅	CD ₂	CD ₁₉	CD ₁₀	CD ₃₃	T β	JH
1	-	ND	-	-	75%	82%	61%	ND	R	R
2	-	ND	-	-	45%	72%	85%	ND	G	R
3	-	ND	-	-	81%	87%	-	ND	G	R
4	+	+	-	-	-	56%	70%	40%	G	G
5	+	±	-	-	-	66%	78%	90%	G	G

a) R 为重排, G 为胚型。

2.2 急性白血病 T β 和 CD_{3 ϵ} 基因表达的分析

T 细胞分化过程中最先重排的是 TCR 分子 δ 链和 γ 链基因, 但因发现它们在非 T 急性白血病中有较高机率的重排, 因而这两种基因的重排不能作为 T 谱系的标志^[7,8]。T β 基因在少数分化及早期的 T 系细胞中仍保持胚系构型, 并且 20% 的非 T 源性白血病中也可检出 T β 基因重排。为了寻找反映 T 谱系更加特异和早期的标志, 我们研究了 T β 基因和 CD_{3 ϵ} 基因在各型

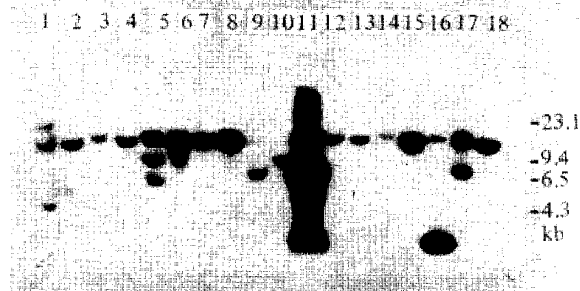


图 1 白血病病例样本细胞 DNA 和 JH 探针 Southern Ep 印迹杂交图
4, 14 为 T-ALL, 1—3, 6—8, 11—12, 15, 18 为 ANLL,
5, 9—10, 16—17 为非 T-ALL

白血病中的转录。

应用 Northern 杂交技术,我们对各种白血病细胞株和 32 例急性白血病样本的 $T\beta$ 基因表达进行了分析(图 2)。结果显示,7 株 T 细胞株和 6 例具有 $T\beta$ 基因重排的 T-ALL 均有 1.3 kb 的 $T\beta$ 基因转录产物。3 例无 $T\beta$ 基因重排的 T-ALL 中,2 例无 $T\beta$ 基因转录,1 例有 1.1 kb 的 $T\beta$ 基因转录产物。3 株 B 细胞株和 22 例非 T 白血病样本(其中 3 例有 $T\beta$ 基因重排)的 $T\beta$ 基因均无转录,1 例 CD_{21}^{+} 的 C-ALL 出现 1.0 kb 的 $T\beta$ 基因产物。上述结果说明,1.3 kb 的 $T\beta$ 基因转录产物较 $T\beta$ 基因重排更能特异地反应肿瘤细胞的 T 细胞谱系。据文献报道,1.3 kb 和 1.0 kb 的 $T\beta$ 基因转录产物分别由完全重排(V-D-J-C)和部分重排(D-J-C)的 $T\beta$ 基因编码^[9],本研究结果提示,非 T 细胞中重排的 $T\beta$ 基因倾向部分重排或有转录障碍。

CD_3 分子是 T 细胞识别抗原过程中起信号传导作用的重要分子,人的 CD_3 分子由 γ , δ , ϵ 等链组成。虽然 CD_3 蛋白分子仅表达于成熟的 T 细胞表面,但编码 CD_3 分子各链的基因在 T 细胞分化的早期就已开始转录^[3]。能否将其转录产物作为 T 细胞谱系的标志,是本研究所关心的问题。我们的研究结果显示,所有的 T 细胞株均表达 1.4 kb 的 $CD_{3\epsilon}$ 基因转录产物,而非 T 细胞株则为阴性。对急性白血病样本 RNA 的狭缝印迹杂交结果发现,15 例 T-ALL 均有 $CD_{3\epsilon}$ 基因转录产物,而 15 例非 T 细胞白血病均为阴性(图 3)。本研究中 2 例 $T\beta$ 基因为胚系构型,表型为 CD_7^{+} , DR^{+} 的病例样本亦被检出 $CD_{3\epsilon}$ 基因转录产物,表明 $CD_{3\epsilon}$ 基因的转录出现于细胞分化的极早阶段。上述结果提示, $CD_{3\epsilon}$ 基因的转录产物尤其适合作为识别处于分化极早期 T 系肿瘤细胞的谱系标志。

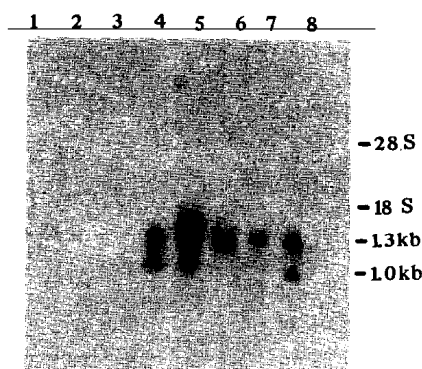


图 2 人白血病细胞株 RNA 与 $T\beta$ 基因探针 Northern 印迹杂交图

B 细胞株: 1——Raji, 2——Dandi, 3——Bri-8;
T 细胞株: 4——Hut78, 5——HPB-ALL, 6——
GH, 7——H9, 8——JM₁

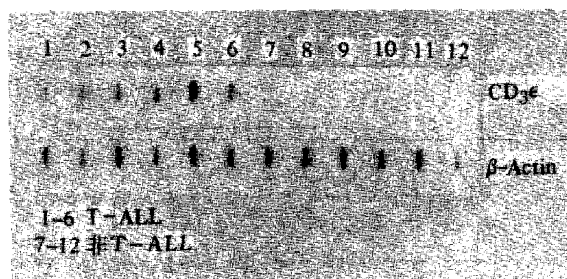


图 3 白血病病例样本总 RNA 与 $CD_{3\epsilon}$ 基因探针狭缝印迹杂交图

2.3 急性白血病髓过氧化物酶(MPO)基因表达的研究

急性髓细胞白血病(AML)是成人白血病的常见类型,MPO 组化染色阳性是诊断此类白血病的重要依据,FAB 协作组将 $\geq 3\%$ 的 MPO 阳性幼稚细胞作为 AML 的诊断标准。但临床上一些 AML 病例的 MPO 组化染色显示阴性,经研究发现部分病例是因其肿瘤细胞中 MPO 颗粒太小,不足以被光学显微镜检测出来,另一些则因其 MPO 蛋白缺乏酶活性^[10,11]。我们应用反转录——PCR 技术从 HL-60 细胞中克隆了 MPO 基因 cDNA 片段^[12],将其作为探针,从

RNA 水平分析研究了各型白血病的 MPO 基因表达。

Northern 印迹分析结果显示,HL-60 细胞,AML 样本表达约 3kb 的 MPO 基因产物,而淋巴细胞白血病株均为阴性。用狭缝印迹杂交技术检测不同类型(M₁—M₅)AML 样本的 MPO 基因转录水平发现,M₃ 型 AML 表达最高,M₂ 次之,M₄ 与 M₁ 较低,M₅ 为阴性,这与 Zaki 等人的报道类似^[13]。本研究中对 22 例 ALL 样本的 MPO 基因分析大多数显示阴性,极少数显示阳性(图 4),后者可能是样本中的正常粒细胞所致,因为幼稚细胞比例低于 80% 的 ALL 样本,出现 MPO 阳性的机率较高。上述结果表明,MPO 基因转录产物可较特异地反映白血病的粒细胞谱系。由于一些病例样本中的正常粒细胞有可能干扰结果的判断,因而采用原位杂交技术检测 MPO 基因表达,可提高诊断的精确性。

本研究对 1 例幼稚细胞数为 90% 的疑难病例进行了分析,该病例样本的 MPO 组化染色显示阴性,表型为 DR⁺,CD₇⁺,基因分析结果显示 MPO 基因转录产物阳性,CD₃ε 基因表达阴性,Tβ 基因为胚系状态,表明该病例属粒系急性白血病。两例 MPO 组化染色可疑阳性的病例,经检测 MPO 基因转录阳性,表明 MPO 基因转录产物分析更为敏感。

根据本研究结果,与白血病细胞谱系相关的早期基因标志包括:与 B 系白血病相关的 JH 基因重排,与 T 系白血病相关的 Tβ 基因重排、1.3kb 的 Tβ 基因转录产物、CD₃ε 基因转录产物和与粒系白血病相关的 MPO 基因转录产物。在急性白血病分型中,应采用综合性多参数分析标准,除结合形态、组化和表型分析外,同时分析多个细胞谱系相关基因,将有利于提高诊断的精确性。

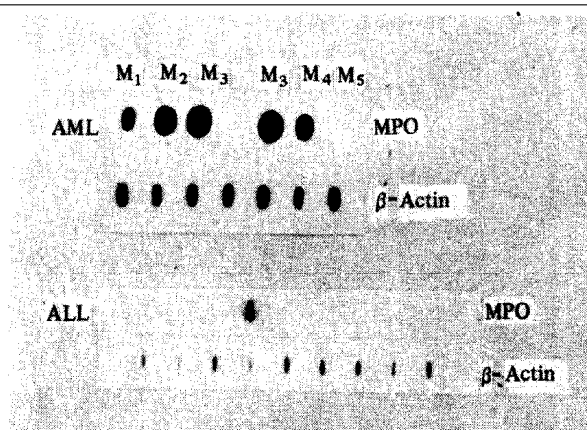


图4 急性白血病样本总 RNA 与 MPO 基因探针的狭缝印迹分析

M₁—M₅ 表示 AML 的分型

参 考 文 献

- [1] Bai, Y., Shen, M. Y., Zhang D. F. et al., *Science in China*, 1991, 34(11): 1319—1328.
- [2] Korsmyer, S. J., Arnold, A., Bakhshi, A. et al., *J. Clin Invest*, 1983, 71: 301—313.
- [3] Furley, A. J., Mizutani, S., Weibaecher, K. et al., *Cell*, 1986, 46(6): 75—87.
- [4] Chomczynski, P., Sacchi, N., *Anal Biochem.*, 1987, 162(1): 156—159.
- [5] Chanmplin, R., Gale R. P., *Blood*, 1989, 73(8): 2051—2066.
- [6] Griesser, H. F., Tkachuk, D., Reis, M. D. et al., *Blood*, 1989, 73(6): 1402—1415.
- [7] Griesser, H. F., Lenert, K. et al., *Blood*, 1986, 68(2): 592—594.
- [8] Hera, J., Benedict, S. H., Champagne, E. et al., *J. Clin Invest*, 1988, 82(6): 1974—1982.
- [9] Yancopoulos, G. D., Alt, F. W., *Ann. Rev. Immunol.*, 1986, 4: 339—368.
- [10] Vainchenker, W., Villeral, J. L., Tabilio, A. et al., *Leukemia*, 1988, 2: 274—281.
- [11] Zaki, S. R., Chan, W. C., McKolanis, J. et al., *Clin Immunol. Immunopathol.*, 1989, 50(3): 283—297.
- [12] 朱元晓、赖春宁、王建安等, *生物工程学报*, 1993, 9(1): 21—24.
- [13] Zaki, S. R., Austin, G. E., Swan, D. et al., *Blood*, 1989, 74(6): 2096—2102.