

· 临床研究 ·

染色体 6q16.3 区域一个与儿童急性淋巴细胞白血病相关表达序列标记的鉴定

康睿, 曹励之, 谢岷, 陈英

(中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 寻找染色体 6q16.3 区域与儿童急性淋巴细胞性白血病(ALL)相关的表达序列标记(EST),为筛选儿童 ALL 候选基因打下基础。方法 运用生物信息学同源性比较筛选 EST 的策略,结合逆转录 PCR 方法,检测 6q16.3 区域的相关 EST 在儿童 ALL 淋巴细胞和正常淋巴细胞中的表达。结果 在 6q16.3 区域筛选到一个在儿童 ALL 细胞中低表达的 EST AA403058,与正常淋巴细胞相比较,在 10 例儿童 ALL 淋巴细胞中的 7 例其表达下调($P < 0.001$)。结论 染色体 6q16.3 区域 EST AA403058 在儿童 ALL 中表达下调,提示其可能参与儿童 ALL 癌变过程,为克隆儿童 ALL 相关基因提供了新线索。 [中国当代儿科杂志, 2005, 7(2): 147-149]

[关键词] 表达序列标记;白血病,淋巴细胞,急性,儿童;6q16.3;基因表达

[中图分类号] R73 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)02-0147-03

Identification of the expressed sequence tags associated with childhood acute lymphoblastic leukemia at chromosome 6q16.3

Rui KANG, Li-Zhi CAO, Min XIE, Ying CHEN. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Cao L-Z, Email: caolizhi318@hotmail.com)

Abstract: Objective To identify the expressed sequence tags (EST) associated with childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) at chromosome 6q16.3, so as to clone candidate genes at the locus. **Methods** The expression of EST at 6q16.3 in lymphocytes was detected using EST homology analysis in bioinformatics along with reverse transcription-polymerase chain reaction in 10 children with ALL and 5 healthy children. **Results** The EST AA403058 expression decreased in seven of ten ALL children compared with that in healthy children ($P < 0.001$). **Conclusions** The EST AA403058 expression is down-regulated in childhood ALL, suggesting it may be involved in the development of childhood ALL. This study provided important information toward cloning childhood ALL associated genes.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(2):147-149]

Key words: Expressed sequence tags; Lymphoblastic leukemia, acute, childhood; 6q16.3; Gene expression

白血病是我国儿童和青少年最常见的恶性肿瘤疾病,其中又以急性淋巴细胞性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)最为多见,占儿童白血病 70% 左右。同许多其它肿瘤一样,ALL 也是一个多基因多阶段作用的结果,涉及多种癌基因、肿瘤抑制基因的改变,如癌基因 RAS、MYC、HOX11、TAL1,肿瘤抑制基因 p53 和 GRIK2 等。目前这种疾病的确切分子机制仍不很清楚。九十年代以来,杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)与肿瘤的关系引起了广泛的注意。文献报道儿童 ALL 存在以下杂合性缺失位点:6q、9p、11q、12p、17q 等,其中染色体 6q

是频繁丢失的“热点”区域^[1-5]。提示这些区域存在某种或某些未知的儿童 ALL 相关基因。最近,我们报道中国儿童 ALL 位于 6q16.3 的 2 cM 大小的最小缺失部位,分别为 D6S1709 和 D6S301 标记侧翼,其发现至少一个位点的 LOH 的比例为 30% ~ 40%,提示该区域定位有与儿童 ALL 密切相关的肿瘤抑制基因^[6]。我们利用现存大量表达序列标记(expressed sequence tags, EST)资源,从位于 6q16.3 儿童 ALL 最小缺失区域的 EST 着手,应用逆转录 PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法,筛选、鉴定与儿童 ALL 相关 cDNA 片段。

[收稿日期] 2005-02-23; [修回日期] 2005-03-07

[作者简介] 康睿(1976-),女,在读博士研究生,主攻方向:小儿白血病。

[通讯作者] 曹励之,中南大学湘雅医院儿科,邮编 410008。

1 材料与方法

1.1 EST 的筛选

通过 UCSC (University of California, Santa Cruz) 基因组浏览器 (<http://genome.ucsc.edu/>) 查询 UCSC 数据库 (April, 2003) D6S1709-D6S301 最小缺失区域内 (位于 6q16.3) 的基因资料, 结果显示在这个区间总计有 55 个 EST。对查找到所有 EST 在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 下进行同源性比较、分析, 剔除代表已克隆基因的 EST。然后将剩余的 EST 在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 下进行 EST 之间的同源性比较、分析, 剔除来源于同一族的 EST。选择的标准是: (1) 与已知基因同源性约 50% ~ 85%; (2) EST 长度至少在二百个碱基对以上; (3) 代表未克隆基因; (4) 有关于染色体定位信息的说明。最后筛选到 18 个满足以上条件的 EST。进一步从中随机选取位于最小缺失区域前、中、后 3 个不同位置 EST 进行 PCR 扩增。

1.2 标本采集及淋巴细胞的分离

本院门诊及住院的 ALL (均根据临床表现、外周血涂片、骨髓细胞形态学、免疫学分型及骨髓活检等综合指标, 参照 FAB 诊断标准确诊) 初治患者 10 例, 正常健康儿童 5 例。抽取患者及健康供者外周血 6 mL, 肝素抗凝, 等量生理盐水稀释后用淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞。

1.3 RT-PCR 检测

用 Trizol 试剂 (Gibco 公司) 抽提淋巴细胞总 RNA, 并用 DNA 酶 1 消化除去总 RNA 中的痕量 DNA; 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA。紫外分光光度计测量 A260nm/280nm 比值。用鸟类成髓细胞瘤病毒 (avian myeloblastosis virus, AMV) 反转录酶 (Takara 公司) 合成第一链; 用 2 μ L 的反转录产物作为模板, 按如下的反应条件进行 PCR 扩增: 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环。所需引物如下内对照 (GAPDH) 上游: 5'-AAGCCCATCACCATCTTCCA-3', 下游: 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'; 目标片段 AA403058 上游: 5'-CATGGCACAATCAGACTGAG-3', 下游: 5'-CTGCAACGCCAAGTACATAG-3'; AI357622 上游: 5'-TGTTCTCATCTTAACATGTGG-3', 下游: 5'-GCTGAGTGATCCTGGATAATG-3'; CA395317 上游: 5'-CGCGTCCTGTGTCAGTTGT-3', 下游: 5'-ATCAACTGTTGCGTGAGAGC-3'。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。PCR 产物点样于 1.5% 琼脂糖凝胶

上, EB 染色。电泳结果拍照、扫描后经 Band Leader 软件分析灰度值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS10.0 进行统计学分析, 两组间均数比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 序列相似性搜索结果

查询 UCSC 数据库 (April, 2003), 结果显示 D6S1709-D6S301 最小缺失区域内存在 55 个 EST, 通过 BLAST 工具进行序列相似性搜索, 剔除 37 个代表已知基因的 EST, 筛选出 18 个可能代表新基因的 EST (表 1)。

表 1 位于最小缺失区域的 18 个可能代表潜在新基因的 EST

AA911579	BQ952283	AF017693	AA479978	AW976023	R50763
AV721135	CA395317	AI357622	AI370155	AW339415	AV715036
BG927665	AI004469	BG926235	N49504	AA398235	AA403058

2.2 RT-PCR 检测结果

RT-PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, EB 染色、拍照、扫描后经 Band Leader 软件分析灰度值。结果 EST (AA403058) 在 70% (7/10) 儿童 ALL 淋巴细胞中的表达低于正常儿童 (图 1)。显示在儿童 ALL 细胞中存在着 EST (AA403058) 表达下调 ($t = 7.896, P < 0.001$)。而各组间 GAPDH 表达差异无统计学意义 ($t = 0.639, P > 0.05$)。

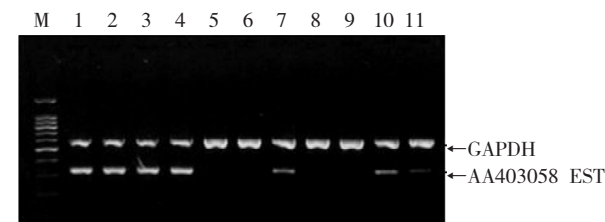


图 1 RT-PCR 检测 AA403058 EST 片段在正常和儿童 ALL 细胞中的表达

M: marker; 1 - 4: 正常人; 5 - 11: 儿童 ALL 病人; GAPDH: 内对照

3 讨论

同其它恶性肿瘤一样, 儿童 ALL 的发生也是由多因素参与, 并经历了多阶段的演变过程, 涉及到多种癌基因的激活和肿瘤抑制基因的失活。病毒因

素、物理因素、化学因素等外部因素均有致 ALL 作用,遗传因素作为内在因素与 ALL 的发病也有着重要的关系,其中细胞遗传学改变是一个很重要的环节,它可以是先天遗传的改变,也可以是病毒感染、电离辐射或化学物质诱发的体细胞突变。现已明确染色体异常,如缺失、易位、倒位和扩增等是儿童 ALL 发病过程中的一个关键步骤。因此,过去 10 年国内外主要关注的是识别 ALL 细胞中非随机的染色体异常,分离染色体异常累及的基因,阐明它们致病的分子机制和与临床的关系。近年来,儿童 ALL 肿瘤抑制基因功能丧失越来越受到医学界的普遍关注^[7]。利用微卫星标记位点(microsatellite marker)进行肿瘤细胞染色体 LOH 分析,已成为目前检测肿瘤抑制基因失活和发现及定位新的肿瘤抑制基因的重要手段之一^[1-3]。我们的研究表明^[6],中国儿童 ALL6q16.3-21 存在高频率 LOH 事件,且 6q16.3 上 D6S1709 和 D6S301 之间为最小缺失部位,提示该区域很可能存在至少 1 个以上的肿瘤抑制基因。人类基因组有约 3×10^9 个碱基对,包含约 2.5~3 万个基因。EST 是 cDNA 的一部分,能够代表基因,因此利用 LOH 频发区域大量 EST 资源,从 EST 入手,可以快捷地找到与儿童 ALL 发病相关基因。

为寻找该区域可能的疾病基因,我们利用生物信息学资源筛选了 3 个位于最小缺失区域的 EST 进行 RT-PCR,最终筛选出一个在儿童 ALL 细胞中表达明显下调的 EST AA403058,结果显示在 10 例儿童 ALL 淋巴细胞中发现 7 例(70%)明显表达下调,10 例 ALL 标本及其正常对照统计学分析有意义,说明 EST AA403058 在儿童 ALL 中存在表达下

调。以上结果表明,EST AA403058 很可能编码一个潜在新的儿童急淋候选肿瘤抑制基因,具有原始创新性,在国内外未见类似报道。目前,我们正在进行其全长 cDNA 的克隆及功能研究。

[参 考 文 献]

- [1] Takeuchi S, Seriu T, van Dongen JJ, Szczepanski T, Tsukasaki K, Takeuchi N, et al. Allelotype analysis in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Oncogene*, 2003, 22 (44): 6970-6976.
- [2] Takeuchi S, Koike M, Seriu T, Bartram CR, Schrappe M, Reiter A, et al. Frequent loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 6: identification of two distinct regions of deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Cancer Res*, 1998, 58 (12): 2618-2623.
- [3] Baccichet A, Qualman SK, Sinnott D. Allelic loss in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Leuk Res*, 1997, 21 (9): 817-823.
- [4] Takeuchi S, Tsukasaki K, Bartram CR, Seriu T, Zimmermann M, Schrappe M, et al. Long-term study of the clinical significance of loss of heterozygosity in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Leukemia*, 2003, 17 (1): 149-154.
- [5] Scholz I, Popp S, Granzow M, Schoell B, Holtgreve-Grez H, Takeuchi S, et al. Comparative genomic hybridization in childhood acute lymphoblastic leukemia: correlation with interphase cytogenetics and loss of heterozygosity analysis [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2001, 124 (2): 89-97.
- [6] 郭碧霞,曹励之,张朝霞,杨明华,康睿,王瑛,等. 儿童急性淋巴细胞性白血病 6q21 区域微缺失的研究及其与临床的关系 [J]. *中华儿科杂志*, 2005, 43 (3): 209-210.
- [7] Sinclair PB, Sorour A, Martineau M, Harrison CJ, Mitchell WA, O'Neill E, et al. A fluorescence in situ hybridization map of 6q deletions in acute lymphocytic leukemia: identification and analysis of a candidate tumor suppressor gene [J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (12): 4089-4098.

(本文编辑:王霞)