

· 临床研究 ·

实时荧光定量 PCR 检测细胞周期蛋白 C 在小儿急性淋巴细胞白血病中的表达

张朝霞, 曹励之, 黄琼, 杨明华, 王卓, 俞燕

(中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 应用实时荧光定量 PCR (RQ-PCR) 法检测人细胞周期蛋白 C (CCNC) 在儿童急性淋巴细胞白血病 (ALL) 中的表达, 以探讨 CCNC 基因与儿童 ALL 的关系。方法 提取正常儿童、初治儿童 ALL 骨髓组织及 ALL 细胞系 6T-CEM 的总 RNA 并逆转录为 cDNA, 应用 RQ-PCR 法检测 CCNC 的表达。结果 在正常儿童、初治儿童 ALL 骨髓及 6T-CEM 细胞系的 CCNC 的阳性表达率均为 100%, 在正常儿童 CCNC 基因平均相对表达强度为 13.5 ± 0.30 , 而在初治儿童 ALL 中为 2.35 ± 0.83 , 两者比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 CCNC 在初治 ALL 患儿中低表达, 提示其有可能是一个抑癌基因。 [中国当代儿科杂志, 2008, 10(1): 14-16]

[关键词] 细胞周期蛋白类; 急性淋巴细胞白血病; 荧光聚合酶链反应; 基因肿瘤抑制; 儿童

[中图分类号] R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)01-0014-03

Detection of human cyclin C gene expression in childhood acute lymphocytic leukemia using real-time fluorescence quantitative PCR

ZHANG Zhao-Xia, CAO Li-Zhi, HUANG Qiong, YANG Ming-Hua, WANG Zhuo, YU Yan. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Cao L-Z, Email: caolizhi318@hotmail.com)

Abstract: Objective To explore the relationship between human cyclin C (CCNC) gene and childhood acute lymphocytic leukemia (ALL). **Methods** The total RNA isolated from myeloid tissues of normal children and of children with newly diagnosed ALL and from ALL cell line 6T-CEM was reversely transcribed into cDNA. Real-time fluorescence quantitative PCR method was used to detect CCNC gene expression. **Results** CCNC was expressed in myeloid tissues of normal children and of children with newly diagnosed ALL as well as 6T-CEM. The relative expression level of CCNC gene in children with newly diagnosed ALL was significantly lower than in normal controls (2.35 ± 0.83 vs 13.5 ± 0.30 ; $P < 0.05$). **Conclusions** CCNC gene shows lower expression in children with newly diagnosed ALL, suggesting that it may be a tumor suppressing gene in childhood ALL. [Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(1): 14-16]

Key words: Cyclins; Acute lymphocytic leukemia; Real-time fluorescence quantitative PCR; Tumor suppressing gene; Child

白血病的发病分子机制至今仍不清楚, 对儿童 ALL 的杂合性缺失 (LOH) 研究发现, 6 号染色体长臂 (6q) 在 ALL 中是最常出现 LOH 的区域之一^[1]。进一步研究发现, 6q21 为儿童 ALL 的高频缺失区, 提示在该区域中极有可能存在一个抑癌基因^[2]。人细胞周期蛋白 C (CCNC) 位于 6q21, 含量在整个细胞周期中变化较小, 仅在 G1 早期有轻度增高。一些研究结果认为^[3], CCNC 在一些 ALL 患儿中出现缺失, 提示其有可能在 ALL 患儿的发病中扮演抑癌基因的角色。

本研究应用实时荧光定量 PCR (RQ-PCR) 的方

法检测 CCNC 基因在正常儿童及初治 ALL 患儿骨髓组织中的表达, 以探讨 CCNC 基因在儿童 ALL 中所起的作用。

1 对象和方法

1.1 对象

22 例儿童 ALL 骨髓标本来自本院, 诊断符合国内白血病诊断标准^[4], 男 13 例, 女 9 例, 中位年龄 6 岁, 免疫分型 B 细胞型 7 例, T 细胞型 15 例, ALL 细胞系 (6T-CEM) 购自中科院上海细胞库, 10 例非白

[收稿日期] 2007-05-10; [修回日期] 2007-07-10

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30571982, 30772353)。

[作者简介] 张朝霞, 女, 博士, 主治医师。主攻方向: 小儿血液。

[通讯作者] 曹励之, 教授, 中南大学湘雅医院儿科, 邮编: 410008。

血病,骨髓形态学正常的儿童骨髓液为正常对照。

1.2 试剂和仪器

RPMI1640 培养基、淋巴细胞分离液、Trizo 试剂、MMV 逆转录试剂盒购自晶美生物公司、引物由上海博亚公司合成,采用德国罗氏公司 LightCycler system 荧光 PCR,混合荧光染料 SYBR Premix Ex Taq 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 总 RNA 提取

采集未经治疗的白血病患儿的骨髓约 2 mL 或健康儿童外周血约 8 mL,抗凝后,用淋巴细胞分离液分离单核/淋巴细胞层,采用 TRIZOL 法提取总 RNA(具体按试剂说明进行),DEPC 水溶解,贮存于 -80°C 备用。

1.4 cDNA 制备

每个总 RNA 样品取 5 μg ,加无 RNase 水至 4 μL ,加入 50 $\mu\text{mol/L}$ Oligo(dT) 1 μL , 70°C 加热 2 min,室温放置 5 min 后,依次加入 RNase 抑制剂 1 μL , $5 \times \text{RT buffer}$ 4 μL ,2.5 mmol/L dNTP 2 μL ,0.1 mmol/L DTT 2 μL ,SupperScript -RTase 1 μL ,无 RNase 水补足 20 μL , 42°C 反应 1 h, 70°C 加热 10 min 中止反应, -20°C 保存备用。

1.5 PCR 引物设计

CCNC 及 GAPDH 基因引物设计均根据标准荧光定量 PCR 引物设计原则,通过 Primer 5.0 程序设计,CCNC 引物序列为:上游引物 5'-GATTGCTGCT-GCTACTTCTG-3',下游引物:5'-CATGTCCTGCA-CATACTG-3',GAPDH 引物序列为上游 5'-AATC-CCATCACCATCTTCC -3',下游 5'-CATCACGCCA-CAGTTTCC -3'。

1.6 实时荧光定量 PCR 反应

22 例初治 ALL 患儿及 10 名健康儿童骨髓组织及细胞系 6T-CEM 细胞均以 CCNC 和 GAPDH 基因引物加入 SYBR green I 荧光染料进行定量 PCR 反应,反应在密闭的 Roche 毛细硅管中进行。反应体系:模板 1 μL ,上下游引物各 10 pmol,10 μL SYBR green I 混合染料,补足无 RNase 水至 20 μL 。混合后注入毛细硅管,高度离心后放入热循环仪中进行反应,条件设置如下: 95°C 10 s 预变性, 95°C 4 s, 55°C 15 s, 72°C 15 s 共 45 个循环。设定在每个循环的变性期结束后,程序自动记录上一个循环最后 10% 时间的平均荧光值,以表示上一个循环结束时的 PCR 产物的量。反应完成后,得到所有标本的记录曲线。软件将自动进行数据分析,调整基线,计算出 Threshold cycle (Ct 值)。每一次反应均以 6T-CEM 细胞为阳性对照,以无 RNase 水代替模板为阴

性对照。

1.7 相对定量公式及表达量计算

最近 Livak 等^[5]设计了一种比较阈值法来测定目的基因的相对表达,他们根据数学推导得出目的基因的量 $= 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$,在该公式中,C 代表 Cycle,t 代表 threshold,Ct 值的含义是:每个反应管内的荧光信号到达所设定的域值时所经历的循环数, $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{管家基因}})_{\text{实验组}} - (\text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{管家基因}})_{\text{对照组}}$,所以, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示的是实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数,这一方法比绝对定量更加简便省时。我们根据目的基因 CCNC 和管家基因 GAPDH 的 Ct 值,可以计算出 CCNC 基因的表达相对于 6T-CEM 的变化倍数,由此可以准确的得到 CCNC 在急性淋巴细胞白血病及正常小儿中表达的强弱,结果用专用软件 REST-XL2.0 得出。

1.8 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件进行数据分析,所有数据均采用均数 \pm 标准差表示。均数比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 RNA 纯度和完整性分析

所提取总 RNA 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测可见 3 条清晰的 RNA 带;28S、18S、5S 由强变弱,条带清晰可见,无明显降解(图 1)。紫外分光光度计检测,A260/A280 比值 1.80 ~ 2.0,表明 RNA 纯度较高。

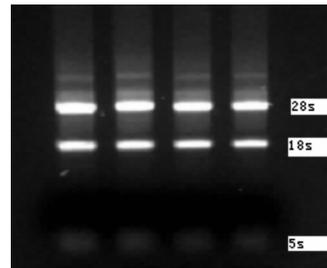


图 1 总 RNA 鉴定结果 各泳道均为提取的 RNA 样本。

2.2 CCNC 基因和 GAPDH 基因在正常儿童及初治 ALL 患儿的荧光定量检测

正常儿童及 ALL 患儿骨髓的 GAPDH 基因的荧光定量曲线显示,其 Ct 值较集中,说明各检测标本 cDNA 差别不大。正常儿童及 ALL 患儿的 CCNC 基因的荧光定量曲线图显示,ALL 患儿的 Ct 值较大,与正常儿童相比,PCR 扩增出现较晚,说明其 CCNC 基因的表达量较正常儿童低。

2.3 CCNC 基因表达的强度

儿童 CCNC 基因平均相对表达强度为 13.5 ± 0.30 , ALL 患儿为 2.35 ± 0.83 , 两者比较, 差异有统计学意义 ($t = 2.85, P < 0.01$)。

3 讨论

细胞周期素 (cyclins) 是一组在结构上同源均含有一个保守序列-周期素盒 (cyclin box) 的蛋白分子, 它们可能与细胞周期素依赖性激酶 (cyclin dependent kinases, CDK) 形成复合体, 在不同的细胞周期中发挥调节作用, 使细胞完成各个时期的转换。CCNC 是 Lew 等^[6-8] 于 1991 年从人和果蝇的 cDNA 文库中分离出来的。因为当时发现这种物质能够弥补一种 *S. Cerevisiae* 菌株缺失的 G1 期细胞周期素基因 CLN1-3 的功能, 而且它在哺乳动物细胞中于 G1 期表达增高, 所以猜测它可能是一种 G1 期细胞周期素。近年编码人类细胞周期素 C 的 CCNC 基因已被克隆并定位于人类染色体的 6q21, 有 12 个外显子, 长度约 16 Kb, 其 cDNA 核苷酸序列长约 2.2 Kb, 有一个 ORF, 编码 303 个氨基酸的蛋白。

Cyclins 与血液肿瘤发生密切相关, 多项研究表明 CyclinA1、CyclinB、CyclinD、CyclinE、CyclinG 分别与多种血液恶性疾病如 ALL、急性髓系白血病、慢性粒细胞白血病、霍奇金淋巴瘤、浆细胞瘤等有关。对于 CCNC 来讲, 同样也与某些血液肿瘤的发生有关^[7]。Li 等^[3] 对 16 例已知存在有 6q21 区域遗传学改变的 ALL 患儿, 用 CyclinCPI 噬菌体克隆通过荧光原位杂交 (FISH) 方法对 CCNC 基因进行检测, 结果发现有 12 例缺失, 发生率约 92%。有报道^[9] 对已知具有 6q 缺失的 ALL 患儿应用 RT-PCR 及 FISH 的方法分析 6q21-6q16 区段的 15 个基因后, 认为 CCNC、GRIK2 及 C6orf111 有可能是儿童 ALL 的候选抑癌基因。

RQ-PCR 技术具有特异性更强、有效解决 PCR 污染和自动化程度高等特点, 同时荧光检测的灵敏

度也更高, 可用于检测低于 100 拷贝 mRNA 的表达, 目前已得到广泛应用。本实验应用 RQ-PCR 方法检测了正常儿童及初治 ALL 患儿骨髓组织的 CCNC 基因的表达, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳及测序保证其扩增的特异性。研究结果显示, CCNC 基因在正常儿童及初治 ALL 患儿均有表达, 表达阳性率达到 100%。同时, 本研究还对 CCNC 基因在正常儿童及初治 ALL 患儿中的表达进行了定量分析, 结果发现 CCNC 基因在正常儿童中的表达强度明显高于初治 ALL 患儿, CCNC 基因在 ALL 患儿中出现表达强度降低, 提示 CCNC 基因可能在儿童 ALL 的发病机制中起抑癌基因的作用, 但对其具体的机制尚不清楚, 有待于进一步的深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, La MK, Hutchinson RJ, Nachman JB, et al. Abnormalities of chromosome bands 15q13-15 in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Cancer*, 2002, 94(4): 1102-1110.
- [2] 杨明华, 曹励之, 俞燕, 张朝霞, 王瑛, 康睿, 等. 儿童急性淋巴细胞白血病 691613 微卫星 DNA 缺失及生物信息学分析 [J]. *中华血液学杂志*, 2006, 27(5): 289-293.
- [3] Li H, Lahti JM, Valentine M, Saito M, Reed SI, Look AT, et al. Molecular cloning and chromosomal localization of the human cyclin C (CCNC) and cyclin E (CCNE) genes; deletion of the CCNC gene in human tumors [J]. *Genomics*, 1996, 32(2): 253-259.
- [4] 张之南, 沈悌. 血液病的诊断及疗效标准 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1998, 185-192.
- [5] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ methods [J]. *Methods*, 2001, 5(4): 402-408.
- [6] Lew DJ, Dulic V, Reed SI. Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast [J]. *Cell*, 1991, 66(6): 1197-1206.
- [7] Jackson A, Carrara P, Duke V, Sinclair P, Papaioannou M, Harrison CJ, et al. Deletion of 6q16-q21 in human lymphoid malignancies: a mapping and deletion analysis [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(11): 2775-2779.
- [8] 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: 吉耕中)