

临床研究报告 ·

TEL-AML1 和 bcl-2 与小儿急性淋巴细胞性白血病早期治疗反应的关系

方拥军¹, 陆瑾¹, 郭锡熔², 陈荣华²

(1. 南京医科大学附属南京儿童医院血液科, 江苏 南京 210008; 2. 南京医科大学第二临床医学院, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的 探讨 TEL-AML1 融合基因在小儿急性淋巴细胞白血病(acute lymphocyte leukemia, ALL)发病过程中的意义。方法 用逆转录聚合酶反应(RT-PCR)检测了 42 例初诊 ALL 病例及正常对照 10 例的 TEL-AML1 融合基因和 bcl-2 的表达,并与其早期治疗反应进行了比较性研究。结果 实验组 TEL-AML1 阳性表达 10 例,阴性率 23.8%, bcl-2 阳性表达 27 例,阳性率 64.3%; TEL-AML1 阳性病例 bcl-2 的表达明显低于阴性病例($P < 0.01$); TEL-AML1 阳性病例高危 ALL 明显低于阴性病例($P < 0.05$); TEL-AML1 阳性病例的地塞米松诱导试验的阳性率高于阴性组($P < 0.05$)。结论 TEL-AML1 出现往往预后较好。RT-PCR 可作为有效的测定方法。

[关键词] 淋巴细胞白血病; TEL-AML1; bcl-2; 急性; 儿童

[中图分类号] R733.71 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1008-8830(2001)01-0061-03

在儿童 ALL 发病过程中,会发生许多染色体的易位,对疾病的发生、发展、转归起决定性的作用。用分子生物学的方法认识这些变化,并作为新的分型标准,是血液学研究的趋势。1994 年, Romana 等^[1]首先用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和荧光原位杂交(FISH)发现了一种新的易位:t(12;21)易位并形成 TEL-AML1 融合基因。这种基因不仅在发病中起重要的作用,而且使得化学药物治疗(化疗)的敏感性增高,预后良好。为了解其与预后的关系,我们用 RT-PCR 的方法测定了我院初诊 ALL 病人的 TEL-AML1 表达,并且与早期治疗反应比较,以了解其与预后的关系。

1 材料和方法

1.1 病例

来自本院血液科 1999 年 1 月至 2000 年 3 月初诊 ALL 病人,共选取 42 例为实验组,其中男 26 例,女 16 例,年龄在 1~12 岁。同期住院病人非 ALL 10 例为对照组。两组病例年龄、性别基本相同。分别观察了 TEL-AML1 阳性与阴性病例的地塞米松诱导试

验^[3]、Bcl-2 的表达率。

1.2 标本采集

所有病人(实验组与对照组)在化疗前采取骨髓 1.5~2 ml 或外周静脉 4~5 ml,用 Na₂EDTA 抗凝。用淋巴细胞分离液提取单个核细胞。Trizol 一步法提取细胞内的 mRNA,用 -70℃ 冰箱冻存。

1.3 RT-PCR

用随机引物 Oligo(dT)₁₅ 将标本逆转录合成 cDNA,步骤为 95℃ 5 min, 37℃ 60 min, 95℃ 5 min, 4℃ 保存。用 TEL-AML1 和 β -Actin 的引物对以上产物进行扩增,步骤如下: 95℃ 1 min 变性, 56℃ 0.5 min 杂交, 72℃ 1 min 延伸, 共 30 个循环, 最后 4℃ 保存^[1]。产物与 MARKER 同时用 1.5% 的琼脂糖电泳, (120 V, 1 h), 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察结果, 摄片。TEL-AML1, bcl-2, β -Actin 的产物分别是 236 bp, 318 bp, 210 bp, 凡是电泳结果与上述碱基数相符的为表达阳性, 反之为阴性。

1.4 试剂及引物

1.4.1 引物 均由中科院上海生化所合成, 序列如下^[1,2]: TEL-AML1, 正义 CGTGGAATTCAAAC-AGTCCA, 反义 AAGAGCTCGCTCATCTTGCTTGG。

[收稿日期] 2000-05-27; [修回日期] 2000-10-08

[基金项目] 本课题得到南京医科大学科研基金资助, 课题编号 NY98044

[作者简介] 方拥军(1968-), 男, 医学博士, 主治医师。

β - Action: 正义 GGCGGCACCACCATGTACCCT, 反义 AGGGGCCGACTCGTCATACT。bcl-2: 正义 CGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGC, 反义 CCGCATGCTGGGGCCGTACAGTTCC。

1.4.2 试剂 淋巴细胞分离液购自中国医学科学院天津血液病研究所, Trizol 购自 Gibco 公司, Oligo (dT)₁₅, AMV, dNTP, TaqDNA 聚合酶、RNase 购自 Promega 公司, PCR 仪由美国 Gene 公司生产。

1.5 统计学处理
采用卡方检验。

2 结果

2.1 TEL-AML1 和 bcl-2 的表达

实验组 42 例中 TEL-AML1 阳性 (236 bp) 10 例, 阳性率为 23.8%; 对照组无 1 例阳性。bcl-2 阳性 (318 bp) 27 例, 阳性率为 64.3%。两组 β -actin 全部阳性 (210 bp)。(见图 1, 2)。

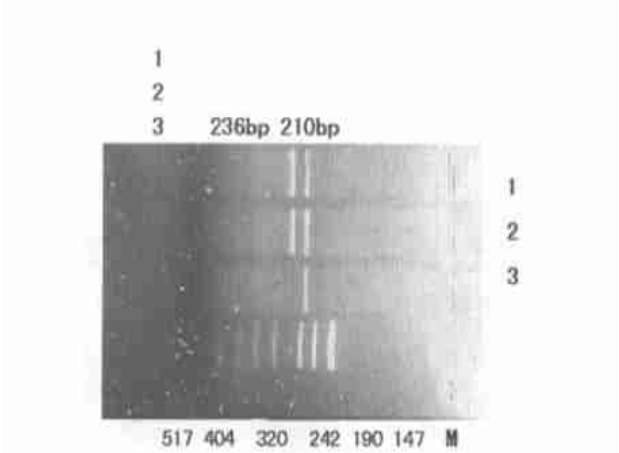


图 1 实验组 TEL-AML1 的电泳结果
1~2 为 TEL-AML1 阳性, 3 为 TEL-AML1 阴性。 β -actin 皆为阳性

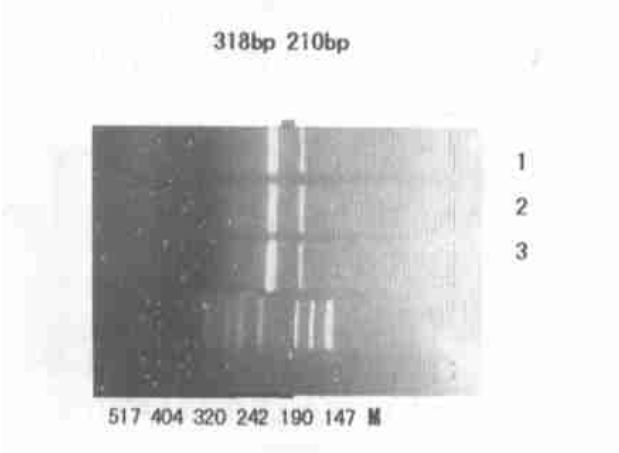


图 2 实验组 bcl-2 的电泳结果
1~3 bcl-2 和 β -actin 皆为阳性

2.2 TEL-AML1 和 bcl-2 的表达比较

统计结果显示, 实验组 TEL-AML1 阴性组 bcl-2 的表达较阳性组的表达明显增高, 差异有显著 (见表 1)。

表 1 实验组 TEL-AML1 和 bcl-2 表达比较		
	bcl-2(mRNA) 检出	bcl-2(mRNA) 未检出
TEL-AML1 阳性	2	8
TEL-AML1 阴性	25	7

注: $\chi^2=8.82, P<0.01$

2.3 地塞米松诱导试验

TEL-AML1 阳性组地塞米松诱导试验良好率高于 TEL-AML1 阴性组, 两组差异有显著性意义。见表 2。

表 2 TEL-AML1 的表达与地塞米松诱导试验的关系		
	地塞米松良好	地塞米松不良
TEL-AML1 阳性	9	1
TEL-AML1 阴性	15	17

注: $\chi^2=4.15, P<0.05$

3 讨论

TEL-AML1 是小儿 ALL 中最常见的染色体易位, 是第 12 号染色体的短臂 1 区 2 带转移到第 21 号长臂 2 区 2 带融合而成, 占小儿 B 系 ALL 的 20%~30% 左右^[2], 而小儿 B 系 ALL 又占总 ALL 的 80% 左右, 故这种易位约占小儿 ALL 的 16%~24% 左右。本文测定的结果为 23.8%, 与国外文献报道基本相符。由于这种易位所累及的遗传物质较少, 用传统的染色体分带技术一般很难检测。本研究应用 PT-PCR 方法^[5], 测定了初诊 ALL 肿瘤细胞的 TEL-AML1 的表达, 同时测定了 bcl-2 基因的表达。 β -Actin 为人类看家基因, 在几乎所有的细胞皆表达, 因此, 我们将其作内参照, 验证我们提取模板及实验方法的正确性。本研究发现, 所有病例 (对照组和实验组) β -Actin 都为阳性。说明了我们提取的模板及方法是正确的。

TEL-AML1 融合基因对疾病的发生、发展、转归意义重大。TEL-AML1 引起 ALL 发病机制可能为以下几方面: AML1/CDF β 的转录功能受到抑制, 影响造血过程中起重要的调控作用, 导致了造血细胞的恶变; 抑癌基因 TEL 的功能下降; 抑癌基因 TEL 继发性的缺失^[6,7]。近年来大量报道其与预后

密切相关,其表达阳性的病例,预后较好^[8~10]。本研究发现:TEL-AML1 阳性病例,bcl-2 表达为 2/10,而阴性病例,bcl-2 表达为 25/42,差异有显著性意义, $P < 0.01$ 。由于 bcl-2 是一个重要的抗凋亡基因,其高表达往往表示肿瘤细胞的凋亡减少,耐药性高,恶性程度高,预示了肿瘤的预后差,说明了 TEL-AML1 与较好的预后有关。

初步的观察还表明:TEL-AML1 阳性组的地塞米松诱导试验良好阳性率为 90%(9/10),而阴性仅为 46.9%(15/32),差异有显著性意义, $P < 0.05$,且阳性组诱导(缓解的治疗效果)明显优于阴性组。由于地塞米松诱导试验体现了化疗的敏感性及预后,TEL-AML1 阳性组的预后明显优于阴性病例。地塞米松诱导阳性表示预后良好,本研究的结果从新的角度进一步支持了 TEL-AML1 与预后良好相关这一论点。经过初步的观察(1 年),初诊 TEL-AML1 阳性组病人(6 例)目前仍处于完全缓解(CR)中。而阴性组却有部分病例已复发或死于并发症。进一步的研究有待于较长时间的观察。

RT-PCR 方法,其敏感性高,特异性强,临床可以作为有效的测定方法。对 TEL-AML1 融合基因表达阳性的缓解期 ALL,可作为监控(minimal residual disease,MRD)有效方法和指标^[4]。由于 TEL-AML1 融合基因表达阳性独特的临床特性,其高表达往往表示预后好,认识这种融合基因不仅为选择合适的化疗方案,也可为基因修补治疗探索提供新的思路。

[参 考 文 献]

[1] Romana SP, Mauchajffe M, Le Coniat M, et al. The t(12; 21)

of acute lymphoblastic leukemia results in a TEL-AML1 gene fusion [J]. Blood, 1995, 85(12): 3662 - 3670.

[2] Romana SP, Poiriel H, Leconiat M, et al. High frequency of t(12; 21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood, 1995, 86(11): 4263 - 4269.

[3] 中华医学会儿科分会血液学组中华儿科杂志编辑委员会. 小儿急性淋巴细胞白血病诊疗建议(第二次修订草案) [J]. 中华儿科杂志,1997, 37(5): 305 - 307.

[4] 牛超,黄薇,苏欣莹,等. 儿童 B 系急性淋巴细胞白血病 TEL-AML1 融合基因的研究 [J]. 中华血液学杂志,1999, 20(2): 61 - 64.

[5] Zuna J, O Hrusak, Kalinova M, et al. TEL-AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis [J]. Leukemia, 1999, 13(1): 22 - 24.

[6] Todd R. G, George F, Barker S, et al. Fusion of the TEL gene on 12p 12 to the AML1 gene on 21q 22 in ALL [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92(5): 4917 - 4912.

[7] Ogawa E, Statake H, Maseki N, et al. Expression of a rnoocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors [J]. Blood, 1998, 91(1): 3134 - 3143.

[8] Lousset C, Jean Michel, M Kalinova, et al. A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR β oncoprotein [J]. EMBO, 1997, 16(1): 69 - 82.

[9] Raynaud S, Cave H, Baens M, et al. The 12; 21 translocation involving TEL and deletion of other TEL allele: two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood, 1996, 87(7): 2891 - 2899.

[10] Jeffrey E, Rubniz, James R. Downing, et al. Tel gene rearrangement in ALL: a new genetic marker with prognostic significance. Journal of Clinical Oncology [J]. 1997, 15(3): 1150 - 1157.

(本文编辑:黄榕)