

# RT-PCR-DGGE 检测急性白血病 儿童胸苷酸合成酶基因多态性研究

陈小文<sup>1</sup>, 岳丽杰<sup>1</sup>, 李长钢<sup>2</sup>, 李成荣<sup>1</sup>, 张民<sup>1</sup>, 石红松<sup>2</sup>

(深圳市儿童医院 1. 儿科研究所; 2. 内科, 广东 深圳 518026)

**[摘要]** 目的 胸苷酸合成酶(TS)是 DNA 合成的关键酶,在 DNA 合成与修复中起重要作用,是叶酸代谢循环中起中心作用的酶类之一,也是以 5-氟尿嘧啶(5-FU)为基础化疗的靶酶,TS 的遗传多态性在抗白血病等肿瘤疾病 5-FU 类药物的体内代谢中起着重要作用。该文研究胸苷酸合成酶基因编码区单核苷酸多态性(cSNP)及基因突变在急性白血病(AL)患儿和正常儿童中的分布情况,以探讨 TS 基因变异与 AL 患儿 5-FU 类药物化疗效应之间可能的相关性。**方法** 应用 RT-PCR-变性梯度凝胶电泳(RT-PCR-DGGE)结合 DNA 直接测序技术,对 53 例 AL 患儿和 115 例正常儿童的 cDNAs 进行了 TS 基因 cSNP 及基因突变的筛查与鉴定,分析各基因型在两组之间的分布差异。**结果** 首次鉴定了儿童 TS 381 A>G (E127E) cSNP 位点,其在 AL 患儿及正常儿童中的等位基因频率分别为 12.3%,13.5%,与国际 SNP 文库中 12.3% 基本一致。该 cSNP 在两组人群的等位基因频率差异无显著性意义,与白血病的易感性无相关性。研究未发现 T349C, G470T 及 C500T 变异。**结论** 采用 RT-PCR-DGGE 结合 DNA 测序法首次确定了儿童 TS 基因存在 381 A>G cSNP 位点,其等位基因频率为 13.1%,基因型分布频率在 AL 患儿及正常儿童两组人群中差异无显著性。

[中国当代儿科杂志,2009,11(4):251-254]

**[关键词]** 胸苷酸合成酶基因;编码区单核苷酸多态性;变性梯度凝胶电泳;急性白血病;儿童

**[中图分类号]** R394.3;733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)04-0251-04

## Polymorphisms of thymidylate synthase gene detected by RT-PCR-denaturing gradient gel electrophoresis in children with acute leukemia

CHEN Xiao-Wen, YUE Li-Jie, LI Chang-Gang, LI Cheng-Rong, ZHANG Min, SHI Hong-Song. Shenzhen Institute of Pediatrics, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518026, China (Yue L-J, Email: lijieyue@yahoo.com)

**Abstract: Objective** Thymidylate synthase (TS) catalyses the conversion of deoxy-uridylylate to deoxy-thymidylate and is a key enzyme for DNA synthesis. TS is the target enzyme of 5-fluorouracil (5-FU) and involved in folate metabolism. TS gene polymorphisms play an important role in the efficiency of fluorouracil activity *in vivo*. This study investigated the allelic frequencies and distribution characters of single-nucleotide polymorphisms within the coding region (cSNPs) of TS gene in Chinese children with acute leukemia (AL) and normal control children in order to explore the possible relationship between the cSNP in human TS gene and chemotherapeutic effects of 5-fluorouracils. **Methods** Bone marrow samples from 53 children with AL and peripheral blood samples from 115 normal children were obtained to prepare complementary DNAs (cDNAs). The cDNAs were analyzed for the polymorphisms in TS gene by reverse transcriptase (RT)-polymerase chain reaction (PCR)-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and direct sequencing. The distributive difference of each genotype between AL children and control children was evaluated. **Results** A polymorphism 381 A>G (E127E) in the coding region of TS gene was firstly identified in the Chinese population. The 381 A>G allelic frequency in AL children and control children was 12.3% and 13.5% respectively ( $P>0.05$ ), which were similar to that in the International SNP Bank (12.3%). The allelic frequency of cSNPs was not associated with the susceptibility to AL. **Conclusions** A polymorphism 381 A>G (E127E) in TS gene was successfully identified in children using RT-PCR-DGGE combined with DNA sequencing. There was no significant difference in the allelic frequency of cSNPs in AL children and normal children.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (4):251-254]

**Key words:** Thymidylate synthase gene; Coding single-nucleotide polymorphism; Denaturing gradient gel electrophoresis; Acute leukemia; Children

[收稿日期]2008-09-24; [修回日期]2008-10-28

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(30471830)

[作者简介]陈小文,男,硕士,助理研究员。主攻方向:分子血液肿瘤学。

[通讯作者]岳丽杰,女,教授,深圳市益田路 7019 号深圳市儿童医院儿科研究所,邮编:518026。

胸苷酸合成酶 (thymidylate synthase, TS 或 TYMS) 是 DNA 合成的关键酶, 在 DNA 合成与修复中起重要作用, 是叶酸代谢循环中起中心作用的酶类之一, 也是以 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 为基础化疗的靶酶。目前, 国内外研究较多的是 3 种多态性 (5'-UTR 重复序列拷贝多态性、5'-UTR 重复序列 SNP、3'-UTR 的 1 494 bp 处存在 6 bp 核苷酸片段的缺失或插入多态性) 与肿瘤易感性和预后关系的研究<sup>[1~9]</sup>, 关于编码区的单核苷酸多态性 (cSNP) 研究则比较少, 国内未见报道。本实验室曾利用反转录-PCR-变性梯度凝胶电泳法 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, RT-PCR-DGGE) 结合 DNA 测序对多种基因编码区的单核苷酸多态性和基因突变的情况进行了研究报道并取得了不错的效果<sup>[10~12]</sup>。为此, 我们拟对急性白血病 (AL) 患儿组和正常对照组的 TS 基因突变及多态性情况进行扫描分析, 现将结果报告如下。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

自 2003 年 1 月至 2005 年 12 月我院血液科住院的 AL 患儿共 53 例, 男性 31 例, 女性 22 例, 中位年龄 4.3 岁 (5 d 至 12 岁); 其中急性淋巴细胞白血病 (ALL) 40 例 (T-ALL 4 例, B-ALL 33 例, 3 例未做免疫分型), 急性髓细胞白血病 (AML) 12 例 ( $M_{2a}$  6 例,  $M_3$  1 例,  $M_{3b}$  1 例,  $M_{4c}$  1 例,  $M_{5b}$  2 例及  $M_7$  1 例), 急性混合细胞白血病 1 例。全部病例均为初发。AL 诊断标准按张之南主编《血液病诊断及疗效标准》<sup>[13]</sup>。正常对照为非造血系统疾患的儿童 115 例, 其中男性 73 例, 女性 42 例, 中位年龄 4.2 岁 (4 月至 12 岁)。

### 1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取及 cDNA 的制备 初次发病的 AL 患者在化疗及输血前, 在患儿家长知情同意的情况下抽取骨髓液 (白血病细胞比例占 80% 以上) 1~1.5 mL, 或正常儿童的外周血 1.5~2 mL, 使用 QIAamp<sup>®</sup> RNA Blood Mini Kit (QIAGEN, 德国) 抽提总 RNA, 紫外分光光度计测定浓度和纯度。1  $\mu$ g 总 RNA 使用禽成髓细胞瘤病毒 (AMV) 逆转录酶 (大连宝生物公司) 逆转录获取 cDNA。

1.2.2 PCR (1) 全长 cDNA 编码区扩增: 参照 mRNA 碱基序列 (基因库登录号: NM\_001071) 设计引物。上游引物: 5'-GTCCCGCCGCGCCACTTC-3',

下游引物: 5'-GCATCCAGCCCAACCCCTAAAGAC-3', 由上海生工或大连宝生物公司合成。(2) 巢式或半巢式 PCR: 应用软件 WinMelt<sup>™</sup> 2.0 自行设计 2 对引物, 设计的突变检测范围涵盖国际 SNP 文库已报道的 4 个位点即: T349C, A381G, G470T, C500T [SNP linked to Gene TYMS (geneID: 7298) at dbSNP, Revised: June 9, 2004 8: 18 AM] 的 cSNPs 检测, 其中每对引物中有一条的 5' 端加上 40 个只含 GC 碱基的片段 (GC clamp, GC 夹), PCR 扩增在 PTC-200 热循环仪 (美国 MJ Research<sup>™</sup> 公司) 上进行 (表 1)。

表 1 人类 TS 基因 PCR-DGGE 的引物序列

引物对	包含的检测突变位点	引物序列 (5'-3')
1F/R	T349C, A381G	GC 夹-GGTGTTTTGGAGGAGTTC/ GGAGAATCCCAGGCTGTC
2F/R	G470T, C500T	GC 夹-TATGGCTTCCAGTGGAGGC- ATTTT/GCGCAAGCGCACATGAT- GATCTCTCTG

注: GC 夹序列为: 5'-GCCCCGCCCGCCCTGCCCGCC-  
CCCCGCCCGCCCGC-3'

1.2.3 DGGE 筛查变异 制备 10% 聚丙烯酰胺凝胶 (丙烯: 双丙烯 = 37.5: 1), 变性剂梯度范围为 30%~60% (100% 变性为 40% 甲酰胺及 7 mol/L 尿素), 呈线性梯度增加, 方向与电泳方向平行。25  $\mu$ L PCR 扩增产物与等量的载样缓冲液混合, 于 60 $^{\circ}$ C (不同引物对电泳温度有调整 50~65 $^{\circ}$ C), 150 V 的条件下电泳 6 h, 用 50 mg/L 溴化乙锭 1  $\times$  TAE 染色 5 min, 1  $\times$  TAE 缓冲液浸泡脱色 20 min, 紫外灯下观察电泳结果并摄像。主要仪器为 DCode<sup>™</sup> 基因突变检测系统 (美国 BIO-RAD 公司), GDS800 凝胶成像分析系统 (美国 UVP 公司)。主要试剂为丙烯酰胺、双丙烯酰胺、去离子甲酰胺和尿素 (美国 AMRESCO 公司)。

1.2.4 DNA 测序分析 对在 DGGE 分析中发现的有异常条带的样本进行测序 (测序由上海生工或大连宝生物公司完成)。参照基因库中 mRNA 序列判断每一变异, 并经基因组 DNA 扩增测序再验证。

1.2.5 杂合性分析 (heteroduplex analysis, HA) 试验 为避免同一对引物检出的相似突变子不必要的全部测序, 相似突变子进行 HA 试验验证。即将 DGGE 检出的所有相似突变子 PCR 产物与已测序验证的突变子 PCR 产物分别混合, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 65 $^{\circ}$ C 60 min, 使其形成杂合子, 再进行 DGGE 分析, 如果两种突变子不完全一致, 则会出现新的错配杂合子, DGGE

分析结果中就会出现新的条带,反之,则为与已测序验证的突变子为同种突变子。

1.2.6 统计学分析 用基因计数法分别统计白血病组和对照组基因型和等位基因的分布频率。数据经 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验后,用 SPSS 11.5 计算机统计软件进行分析。两组之间的基因型和等位基因分布频率的差异、人群 TS 基因型分布用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DGGE 及 DNA 测序结果

利用 DGGE 结合 DNA 测序法对 53 例 AL 患儿和 115 例健康儿童 TS 基因进行了包含已报道的 4 个位点的 cSNPs 检测,首次鉴定了儿童 TS 381 A > G (E127E) cSNP 位点,其 DGGE 检测代表性图及

测序图见图 1,2。

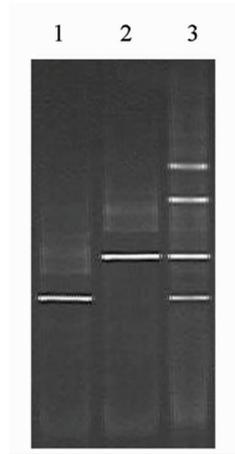


图1 Ts-381 位点 DGGE 检测代表图 1:381GG 基因型(纯合突变型);2:381AA 基因型(野生型);3:381AG 基因型(杂合型)。

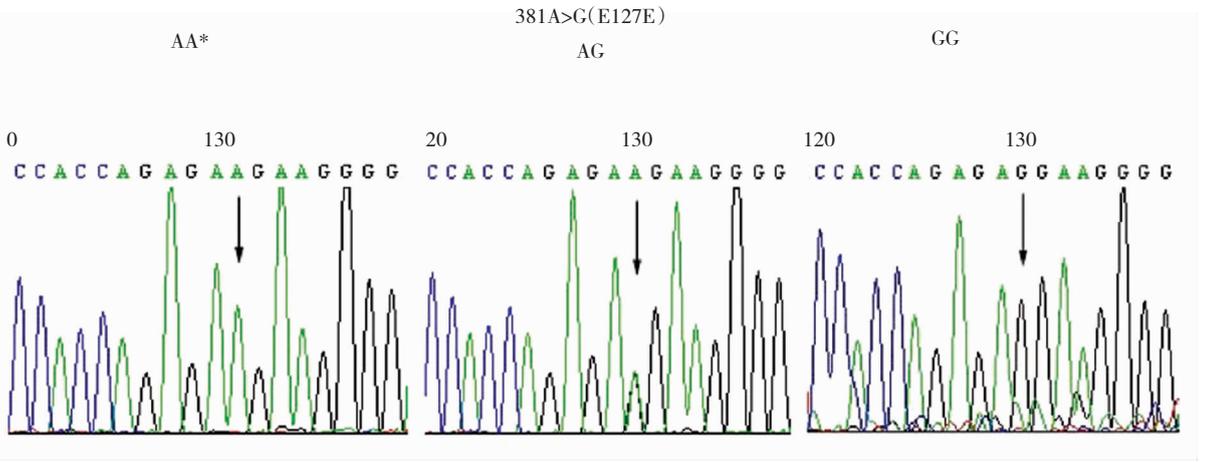


图2 TS-381 位点测序图 星号(\*)代表野生型,箭头(↓)代表变异的相关碱基

### 2.2 SNP 分析

由于 DGGE 中类似 381 A > G 等位基因杂合子条带(381A/G,类似图 1 中 DGGE 检测图泳道 1 的四条带型模式)的样本例数较多、频率较高,因此我们对此类标本进行了 HA 试验,结果没有出现新的条带,即表明类似 381 A/G 等位基因均为 381 A/G。通过对 168 例 cDNAs 片段的 PCR-DGGE 检测、DNA 测序及 HA 试验,我们确定了 AL 患儿及正常儿童 TS 编码区的 381 A > G 等位基因频率分别为 12.3% [0/53 (GG), 13/53 (AG)]、13.5% [1/115 (GG), 30/115 (AG)],两组人群的等位基因频率差异无显著性意义( $P > 0.05$ ),其等位基因总频率为 13.1%,基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,表明这个 cSNP 与白血病的易感性无相关性。此次研究未

检测到 T349C, G470T 及 C500T 变异。

## 3 讨论

作为 DNA 合成的关键酶,胸苷酸合成酶的遗传多态性在抗白血病等肿瘤疾病 5-FU 类药物的体内代谢中起着重要作用。5-FU 是胸苷酸合成的主要抑制剂之一,广泛用于肿瘤的化疗。其代谢产物与 TS 形成络合物,干扰 DNA 合成从而杀死肿瘤。TS 基因多态性导致其在肿瘤细胞中的表达效率、活性等不同。因此对其基因多态性与化疗药物敏感性关系的研究将对肿瘤的预防和治疗具有重要指导意义<sup>[1-9]</sup>。

目前,国内外研究较多的是 TS 基因 3 种多态性

与肿瘤易感性和预后关系的研究,关于编码区的 SNP 研究则比较少,国内未见报道。SNP 基因库中查到已报到的 SNP 位点为 4 个(T349C, A381G, G470T, C500T),其中 381G 的等位基因频率为 8.2%,其余的没有等位基因频率数据,可能主要以散发的基因突变形式存在。我们对 AL 患儿组和正常对照组的 TS 基因突变及多态性情况进行扫描分析,以鉴定此 4 个 SNP 位点在儿童以及 AL 患儿中的分布情况,甚至希望发现新的功能性突变位点,从而为 AL 患儿的临床用药提供参考。DGGE 作为一种近年来发展较快的突变检测方法,以其高检出率(达 100%)、重复性好等特点而受到普遍关注,以 DGGE 方法作为基因突变筛查工具的报道也日渐增多<sup>[14~16]</sup>。而我们实验室以往的研究也表明采用 DGGE 结合测序法,不但对已知的突变检出率高,准确性好,而且还可发现未知突变<sup>[10, 11]</sup>。通过设计 2 对引物对 53 例 AL 患儿和 115 例健康儿童 TS 基因进行了包含已报道的 4 个位点的筛查,本研究确定了 AL 患儿及正常儿童 TS 编码区的 381 A>G 等位基因频率分别为 12.3%,13.5%,等位基因总频率分别为 13.1%,高于之前国际 SNP 文库中的 8.2% (Revised: June 9, 2004 8:18 AM),与现国际 SNP 文库中 12.3% (BUILD 129, Revised: May 25, 2006 1:38 PM) 基本一致。同时,本研究未检测到 T349C, G470T 及 C500T 变异位点。通过本组实验的研究结果,我们认为儿童的 TS 基因多态性可能还是主要以 5'-UTR 重复序列拷贝多态性、5'-UTR 重复序列 SNP、3'-UTR 的 1 494 bp 处存在 6 bp 核苷酸片段的缺失或插入多态性等 3 种形式对肿瘤化疗等过程产生影响,这将是本实验室下一步研究工作的一个侧重点,也希望为其他同类研究提供参考。

### [参 考 文 献]

[1] 崔雅静 张健慧. 胸苷酸合成酶(TS)基因多态性及其与肿瘤的关系[J]. 国外医学遗传学分册, 2004, 27(6):349-353.  
[2] Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy[J]. Pharmacogenomics J, 2001, 1(1): 65-70.

[3] Nief N, Le Morvan V, Robert J. Involvement of gene polymorphisms of thymidylate synthase in gene expression, protein activity and anticancer drug cytotoxicity using the NCI-60 panel[J]. Eur J Cancer, 2007, 43(5): 955-962.  
[4] Kuramochi H, Tanaka K, Oh D, Lehman BJ, Dunst CM, Yang DY, et al. Thymidylate synthase polymorphisms and mRNA expression are independent chemotherapy predictive markers in esophageal adenocarcinoma patients[J]. Int J Oncol, 2008, 32(1): 201-208.  
[5] Matsui T, Omura K, Kawakami K, Morita S, Sakamoto J. Genotype of thymidylate synthase likely to affect efficacy of adjuvant 5-FU based chemotherapy in colon cancer[J]. Oncol Rep, 2006, 16(5):1111-1115.  
[6] Marsh S. Thymidylate synthase pharmacogenetics[J]. Invest New Drugs, 2005, 23(6):533-537.  
[7] Krajcinovic M, Costea I, Primeau M, Dulucq S, Moghrabi A. Combining several polymorphisms of thymidylate synthase gene for pharmacogenetic analysis[J]. Pharmacogenomics J, 2005, 5(6): 374-380.  
[8] Danenberg PV. Pharmacogenomics of thymidylate synthase in cancer treatment[J]. Front Biosci, 2004, 9:2484-2494.  
[9] Etienne MC, Ilc K, Formento JL, Laurent-Puig P, Formento P, Cheradame S, et al. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: relationships with 5-fluorouracil sensitivity[J]. Br J Cancer, 2004, 90(2): 526-534.  
[10] 陈小文, 岳丽杰, 李长钢, 张民, 陈运生, 李成荣. 逆转录-PCR-变性梯度凝胶电泳法检测葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(9):1048-1051.  
[11] 陈小文, 岳丽杰, 李成荣, 李长钢, 石红松, 张民. CDA 基因多态性与阿糖胞苷敏感性关系的研究[J]. 中华血液学杂志, 2008, 29(7): 459-463.  
[12] 李长钢, 陈小文, 陈运生, 王纓, 赵维玲, 石红松, 等. 运用 PCR-DGGE 技术检测葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏的初步研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2007, 9(6):529-532.  
[13] 杨天楹. 急性白血病[M]. //张之南. 血液病诊断及疗效标准. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998, 168-214.  
[14] van der Hout AH, van den Ouweland AM, van der Luijt RB, Gille HJ, Bodmer D, Brüggewirth H, et al. A DGGE System for comprehensive Mutation Screening of BRCA1 and BRCA2: Application in a Dutch Cancer Clinic Setting[J]. Hum Mutat, 2006, 27(7): 654-666.  
[15] Rendtorff ND, Bjerregaard B, Frödin M, Kjaergaard S, Hove H, Skovby F, et al. Analysis of 65 tuberous sclerosis complex (TSC) patients by TSC2 DGGE, TSC1/TSC2 MLPA, and TSC1 long-range PCR sequencing, and report of 28 novel mutations[J]. Hum Mutat, 2005, 26(4): 374-383.  
[16] Lacerra G, Fiorito M, Musollino G, Di Noce F, Esposito M, Nigro V, et al. Sequence variations of the alpha-globin genes: scanning of high CG content genes with DHPLC and DG-DGGE[J]. Hum Mutat, 2004, 24(4): 338-349.

(本文编辑: 吉耕中)