

• 临床检验研究论著 •

Cyclin D1 基因多态性和儿童急性淋巴细胞性白血病相关性研究

钱培新¹, 王 蕾²

(1. 江苏省张家港市第一人民医院检验科 215600; 2. 江苏省张家港市中医医院检验科 215600)

摘 要:目的 探讨细胞周期素 D1(Cyclin D1)基因 A870G 多态性和儿童急性淋巴细胞白血病之间的相关性。方法 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测 118 例急性淋巴细胞白血病患者(实验组)和 160 例健康儿童(对照组)的 Cyclin D1 A870G 基因型,比较两组基因型频率和等位基因频率。结果 实验组基因型频率为 AA 型 30.51%、AG 型 50%、GG 型 19.49%,对照组基因型频率为 AA 型 20.63%、Aa 型 47.5%、GG 型 31.67%,差异均有统计学意义($P<0.05$)。实验组等位基因 A、G 的分布频率依次为 55.51%、44.49%,对照组等位基因 A、G 的分布频率依次为 44.38%、55.62%,差异均有统计学意义($P<0.05$)。B 细胞型患儿基因型频率为 AA 型 50%、AG 型 41.67%、GG 型 8.33%,T 细胞型患儿基因型频率为 AA 型 25.53%、AG 型 52.13%、GG 型 22.34%,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 Cyclin D1 基因 A870G 位点多态性与儿童急性淋巴细胞白血病发病的易感性存在相关性。

关键词:急性淋巴细胞性白血病; 细胞周期素 D1; 多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.13.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)13-1567-02

Correlation between Cyclin D1 gene polymorphism and acute lymphoblastic leukemia in children

Qian Peixin¹, Wang Lei²

(1. Department of Laboratory Medicine, the First People's Hospital of Zhangjiagang City, Zhangjiagang, Jiangsu 215600, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Traditional Chinese Medicine Hospital of Zhangjiagang City, Zhangjiagang, Jiangsu 215600, China)

Abstract: **Objective** To analyze the correlation between Cyclin D1 gene polymorphism and acute lymphoblastic leukemia(ALL) in children. **Methods** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) was used to detect Cyclin D1 A870G genotype in 118 children with ALL(experiment group) and 160 healthy children(control group). Genotype and allele frequencies were compared between the two groups. **Results** The distribution frequencies of genotypes of AA, AG and GG of Cyclin D1 gene were 30.51%, 50.00% and 19.49% in experiment group, and 20.63%, 47.50% and 31.67% in control group, which were significantly different($P<0.05$). The frequencies of allele A and G were 55.51% and 44.49% in experiment group, and 44.38% and 55.62% in control group with significant difference($P<0.05$). The distribution frequencies of genotypes of AA, AG and GG of Cyclin D1 gene were 50.00%, 41.67% and 8.33% in patients with B-cell type, and 25.53%, 52.13% and 22.34% in patients with T-cell type with significant difference($P<0.05$). **Conclusion** Cyclin D1 gene polymorphism might be related with the susceptibility to ALL in children.

Key words: acute lymphoblastic leukemia; Cyclin D1; polymorphism

急性淋巴细胞白血病(ALL)是由于未分化或分化很差的淋巴细胞在造血组织(特别是骨髓、脾脏和淋巴结)无限增殖所致的恶性血液病^[1]。ALL 多发于儿童,其发病的高峰年龄为 3~4 岁,男性的发病率略高于女性^[2]。目前的研究认为,肿瘤的发生往往和细胞周期调控失常有关。多种细胞周期调节因子与恶性肿瘤演进有关,其中细胞周期素 D1(Cyclin D1)被认为和多种恶性肿瘤的发生密切相关,已有文献报道 Cyclin D1 在乳腺癌、食道癌、甲状腺癌组织中过表达,其多态性和肿瘤的发生以及疗效存在相关性^[3-4]。本研究用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测急性淋巴细胞性白血病患者和健康儿童 Cyclin D1 基因型,并分析其基因多态性和儿童急性淋巴细胞性白血病之间的关联,将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院 2007 年 8 月至 2011 年 4 月收治的 118 例急性淋巴细胞性白血病(ALL)患儿作为实验组,包括男 71 例,女 47 例,其中,≤10 岁者 96 例、≥10 岁 22 例,平均年龄(8.94 ± 2.14)岁;按免疫表型分组包括 T 系 24 例, B 系 94 例, 标危型 98 例,高危型 20 例。对照组 160 例为本院健康体检合格儿童,包括男 95 例,女 65 例,平均年龄(9.64 ± 2.38)岁。

1.2 方法 抽取每例白血病患者骨髓 1 mL 进行白血病的免疫表型分型;抽取每例健康儿童外周血 2 mL,使用试剂盒抽取基因组 DNA(试剂盒由美国 Promega 公司生产)。参考已发表的 Cyclin D1 核酸序列(GenBank No. BC000076)使用 Primer 5 软件设计引物并委托上海 Invitrogen 公司合成,正向引物为 5'-GTG AAG TTC ATT TCC AAT CCG C-3',反向引物为 5'-GGG ACA TCA CCC TCA CTT AC-3'。PCR 反应体系:基因组 DNA 2 mL, 10×PCR buffer 5 μL(大连 TAKARA 有限公司生产),dNTP(25 mmol/L,大连 TAKARA 有限公司生产)3 mL,rTaq DNA 聚合酶 0.5 μL(2.5 U,美国 Promega 公司生产),MgCl₂ 3 mL(25 mmol/L,大连 TAKARA 有限公司生产),正向引物 1 mL,反向引物 1 mL,加水至 50 mL。PCR 条件:94℃预变性 10 min,94℃45 s,60℃45 s,72℃45 s,30 个循环,72℃延伸 10 min。取 PCR 产物 2 mL,ScrF1 内切酶 2 mL,10×buffer 2 mL,加去离子水至 20 mL,37℃水浴 3 h,反应产物 5 mL 加上样缓冲液 1 mL,在 2%的琼脂糖凝胶电泳 30 min,在紫外灯下观察结果并且摄影,通过酶切产物的大小判断基因型。

1.3 统计学处理 使用 SPSS12.0 统计学软件,计数资料使

用卡方检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

以外周血基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 Cyclin D1 基因后, 用 ScrF1 内切酶对 PCR 产物进行消化, 观察其基因型: AA 基因型仅有 1 条 167 bp 条带, GG 基因型有 145 和 22 bp 2 条条带, AG 基因型有 167、145 以及 22 bp 3 条条带(见图 1)。118 例急性淋巴细胞白血病(ALL)患儿中, AA 基因型 36 例、AG 基因型 59 例、GG 基因型 23 例, 等位基因 A 的频率为 55.51%、G 的频率为 44.49%, 具体见表 1。男性 ALL 患儿中, AA 基因型 21 例、AG 基因型 33 例、GG 基因型 10 例; 女性 ALL 患儿中, AA 基因型 15 例、AG 基因型 26 例、GG 基因型 6 例, 具体见表 2。通过对急性淋巴细胞白血病患儿的不同基因表型的 Cyclin D1 基因 870G 位点多态性进行统计分析, 结果发现, 24 例 T 细胞型的患儿中, AA 基因型 12 例、AG 基因型 10 例、GG 基因型 2 例; 94 例 B 细胞型患儿中, AA 基因型 24 例、AG 基因型 49 例、GG 基因型 21 例, B、T 细胞型患儿基因型差异有统计学意义($P<0.05$)。急性淋巴细胞白血病分为 98 例标准风险患儿和 20 例高风险患儿, 标准风险患儿中 AA 基因型 27 例、AG 基因型 53 例、GG 基因型 18 例, 高风险患儿中 AA 基因型 9 例、AG 基因型 6 例、GG 基因型 5 例, 差异无统计学意义($\chi^2=3.96, P=0.14$)。

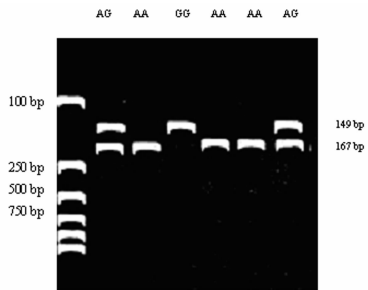


图 1 Cyclin D1 基因型检测结果

组别	基因型			等位基因频率	
	AA	AG	GG	A	G
实验组 [n(%)]	36(30.51)	59(50)	23(19.49)	131(55.51)	105(44.49)
对照组 [n(%)]	33(20.63)	76(47.5)	51(31.87)	142(44.38)	178(55.62)
χ^2	6.67			6.74	
P	0.036			0.009 4	

性别	基因型		
	AA	AG	GG
男性实验组[n(%)]	21(29.58)	33(46.48)	10(14.08)
男性对照组[n(%)]	20(21.05)	45(47.37)	30(31.58)
χ^2	6.06		
P	0.048		
女性实验组[n(%)]	15(31.91)	26(55.32)	6(12.77)
女性对照组[n(%)]	13(20)	31(47.69)	21(32.31)
χ^2	6.18		
P	0.045		

3 讨 论

目前研究认为肿瘤的发生往往与细胞周期调控因子紊乱引起的细胞异常增殖有关。细胞周期分为 G₁ 期、S 期、G₂ 期和 M 期 4 阶段, 由细胞周期蛋白、细胞周期相关蛋白依赖性激酶(CDKs)、和细胞周期相关蛋白依赖性激酶抑制因子(CKIs)三类因子进行精密调控^[5]。其中 Cyclins 起正调节作用, CKIs 发挥负调节作用^[6]。Cyclin D1 作为重要的细胞周期调节因子之一, 其过度表达是多种人类原发性肿瘤的特征, 对肿瘤的诊断和预后判断具有重要意义^[7]。

研究表明, 急性淋巴细胞白血病患者 Cyclin D1 基因的 AA 基因型的频率为 30.51%, 明显高于健康儿童, 而 GG 基因型的频率为 19.49%, 明显低于健康儿童; 并且急性淋巴细胞白血病患者 Cyclin D1 基因等位基因 A 频率较健康儿童为高。Cyclin D1 含 295 个氨基酸, 由染色体 11q13 上的 CCND1 基因编码。Cyclin D1 是细胞周期的关键性调控点, 即细胞 G₁ 与 S 期间调控点的关键细胞因子。研究表明, Cyclin D1 第 4 个外显子第 870 个碱基存在 G-A 单核苷酸多态性(SNP), 该位点的单核苷酸多态性导致了两种不同的转录版本, 即完整转录子 a 和截短转录子 b, 这两种转录子之间的差别在于截短转录子 b 缺少完整转录子 a 所具有的苏氨酸磷酸化位点和蛋白降解所需要的 PEST 功能域, 导致了 Cyclin D1 从细胞核向细胞质转运时间增加, 半衰期延长^[8]。Pakakasama 等^[9](2004)报道, 儿童肝母细胞瘤患者的发病年龄与 Cyclin D1 870G 位点的多态性相关, 肺癌^[10]、直肠癌、胃癌以及肝细胞癌等的发生均与 Cyclin D1 A870G 位点的多态性相关^[11]。

此外, 研究还发现男性急性淋巴细胞白血病患者与男性健康儿童、女性急性淋巴细胞白血病患者与女性健康儿童之间的 Cyclin D1 的基因型和等位基因频率差异有统计学意义, 表明 Cyclin D1 基因型和等位基因的差异和性别无关, B 细胞型急性淋巴细胞白血病患者 AA 基因型的频率为 25.53%, 而 T 细胞型的频率为 50%, T 细胞型 AA 基因型的频率明显高于 B 细胞型, 作者的研究结果和 Hong 等^[12]研究结果相一致。Cyclin D1 基因 A870G 位点多态性与儿童急性淋巴细胞白血病发病的易感性存在相关性。

参考文献

[1] Yang JJ, Cheng C, Devidas M, et al. Ancestry and pharmacogenomics of relapse in acute lymphoblastic leukemia[J]. Nat Genet. 2011, 43(3):237-241.

[2] Lund B, Asberg A, Heyman M, et al. Risk factors for treatment related mortality in childhood acute lymphoblastic leukaemia[J]. Pediatr Blood Cancer, 2011, 56(4):551-559.

[3] Tahara T, Arisawa T, Shibata T, et al. Association between cyclin D1(CCND1) polymorphism and gastric cancer risk in Japanese population[J]. Hepatogastroenterology, 2009, 56(93):1232-1235.

[4] Mavaddat N, Dunning AM, Ponder BA, et al. Common genetic variation in candidate genes and susceptibility to subtypes of breast cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, 18(1):255-259.

[5] Rimpi S, Nilsson JA. Metabolic enzymes regulated by the Myc oncogene are possible targets for chemotherapy or chemoprevention[J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35(2):305-310.

[6] Eguchi T, Takaki T, Itadani H, et al. RB silencing(下转第 1571 页)

能是调节生物体生长、发育和疾病发生过程中有关基因的表达。大量研究表明,miRNA 在肿瘤细胞中表达水平的异常,是肿瘤发生、发展的重要影响因素。其功能的发挥类似于行使肿瘤基因与抑肿瘤基因的功能,除了表达的数量和丰度有所差异外,在某些肿瘤中表达上调而在另一些肿瘤中可能表达下调^[7-8]。

在 2008 年之前,miRNA 被认为在血清和血浆中不能稳定存在,因此 miRNA 的研究仅限于在组织当中,miRNA 被称作基于组织的肿瘤标志物,直到 2008 年美国弗雷德哈钦森肿瘤症研究中心发表了一篇名为“Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection”的文章,提出 miRNA 分子能在细胞外循环并且能明显保持稳定^[9]。血清作为生物检测样本,具有取材方便,创伤小,可连续体外检测的优点,且血清 miRNA 的高度稳定性也使得患者的实际值与实验的测试值相当吻合,并且选择明显上调的 miRNA 可提高诊断的灵敏度^[9]。本实验通过众多文献筛选出与乳腺肿瘤密切相关的 miR-155 作为研究靶点^[3],经 Real-Time PCR 证明 miR-155 在血清中稳定存在并表达,表明从血清中寻找 miRNA 作为乳腺肿瘤分子标志物的可行性。

本实验中,乳腺肿瘤患者血清中的 miR-155 水平较健康人有了显著的升高,并且升高的程度差异有统计学意义。这与 2005 年 Iorio 等^[3]采用乳腺肿瘤组织进行研究所得到的 miR-155 在肿瘤组织中的表达明显下调是相反的结果^[10],但是与 Zhu 等^[6]采用乳腺肿瘤患者血清所得到的结论一致。在病例的选择上,乳腺肿瘤患者均为早、中期,提示 miR-155 或可作为一种血清分子标志物用于乳腺肿瘤的早期诊断。鉴于肿瘤的发生是一个复杂的过程,仅仅采用一种血清 microRNA 作为肿瘤标志物往往特异性不足,若将多种 microRNA 组合使用并与其他类型肿瘤标志物检测相结合,可望显著提高诊断的准确性^[11-12]。个体间血清 microRNA 变异较大,探寻肿瘤发生、发展的不同时期个体血清 microRNA 表达谱的变化规律并阐明作用机制,是将 miRNA 检测应用于恶性肿瘤个体化诊断的一个关键问题。本实验中选用的临床病例偏少,并且对患者的年龄特征、激素受体情况没有做更多的分组,有待更进一步的研究。

现在临床使用的肿瘤标志物促进了诊断的发展,但是目前的诊断技术大都具有较大的创伤性,其临床应用受到限制。而血清 microRNA 作为肿瘤诊断和预后分子标志物不仅具有创

伤小,方法准确、便捷的优势,而且还可改进疾病诊断、肿瘤分类、预后估计、疗效及复发预测的精度。血清 microRNA 作为新兴的肿瘤分子标志物在未来的肿瘤临床诊断和治疗中必将会有更好的应用前景。

参考文献

- [1] 刘新杰,麦沛成,周冬仙. 早期乳腺癌的诊断[J]. 现代诊断与治疗,2001,12(6):378-379.
- [2] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in caenorhabditis elegans [J]. Nature,2000,403(6772):901-906.
- [3] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer[J]. Cancer Res,2005,65(2):7065-7070.
- [4] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum; a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. Cell Research,2008,10(5):1038-1039.
- [5] Ng EK, Chong WW, Jin H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of colorectal cancer patients; a potential marker for colorectal cancer screening [J]. Gut, 2009, 58(2):1375-1381.
- [6] Zhu Weizhu, Qin Wenyi, Ulus A, et al. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects [J]. BMC Research Notes, 2009,2:89-91.
- [7] Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. Dev Biol,2007,302(4):1-12.
- [8] Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans[J]. Science,2001,294:862-864.
- [9] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2008,105:10513-10518.
- [10] Israel A, Sharan R, Ruppin E, et al. Increased microRNA activity in human cancers[J]. PLoS One,2009,4:6045.
- [11] 许建,武治印. 血清 microRNA 在肿瘤诊断和预后评估中的应用 [J]. 科学通报,2010,55(2):449.
- [12] Schaeffer P, Mulcahy HE, Meyer P, et al. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients[J]. Clin Cancer Res,2000,6(10):3823-3826.

(收稿日期:2012-01-10)

(上接第 1568 页)

- compromises the DNA damage-induced G2/M checkpoint and causes deregulated expression of the ECT2 oncogene[J]. Oncogene,2007,26(4):509-520.
- [7] Ryu JM, Lee MY, Yun SP, et al. High glucose regulates cyclin D1/E of human mesenchymal stem cells through TGF-beta1 expression via Ca²⁺/PKC/MAPKs and PI3K/Akt/mTOR signal pathways[J]. J Cell Physiol,2010,224(1):59-70.
 - [8] Izzo JG, Wu TT, Wu X, et al. Cyclin D1 guanine/adenine 870 polymorphism with altered protein expression is associated with genomic instability and aggressive clinical biology of esophageal adenocarcinoma[J]. J Clin Oncol,2007,25(6):698-707.
 - [9] Pakakasama S, Chen TT, Frawley W, et al. CCND1 polymorphism

and age of onset of hepatoblastoma[J]. Oncogene,2004,23(27):4789-4792.

- [10] Gautschi O, Ratschiller D, Gugger M, et al. Cyclin D1 in non-small cell lung cancer; a key driver of malignant transformation [J]. Lung Cancer,2007,55(1):1-14.
- [11] Papadimitrakopoulou V, Izzo JG, Liu DD, et al. Cyclin D1 and cancer development in laryngeal premalignancy patients [J]. Cancer Prev Res(Phila),2009,2(1):14-21.
- [12] Hong X, Wang S, Zhou Y, et al. Cyclin D1 gene polymorphism and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population[J]. Int J Hematol,2005,82(3):206-209.

(收稿日期:2011-12-09)