

· 论 著 ·

qPCR 检测慢性粒细胞性白血病细胞中 BCR-ABL mRNA 的表达及其意义*

陈丕绩¹, 谢意文¹, 侯家兴¹, 蔡巧青²

(1. 深圳市盐田区人民医院, 广东深圳 518081; 2. 北京大学深圳医院, 广东深圳 518036)

摘要:目的 探讨实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 BCR-ABL mRNA 对慢性粒细胞性白血病(CML)患者异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)后体内微小残留病(MRD)的早期预测和监测价值。方法 选取 2013 年 1 月至 2016 年 1 月在深圳市盐田区人民医院、深圳大学医学院及北京大学深圳医院门诊和血液科住院的 CML 患者 67 例作为观察组,同期深圳市盐田区人民医院体检健康人群 50 例为对照组,用 qPCR 检测 CML 患者异基因造血干细胞移植前后 BCR-ABL mRNA 水平。结果 对照组健康人群 BCR-ABL mRNA 检测均为阴性。移植前加速期和急变期的 CML 患者 BCR-ABL mRNA 水平高于慢性期,差异有统计学意义($P < 0.05$);移植后,前 36 个月各时间点 qPCR 检测的 BCR-ABL/ABL 比值均较移植前明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);移植 36 个月后 qPCR 仍然能检测出 BCR-ABL/ABL 的表达水平。结论 qPCR 方法准确可靠,对于临床诊断 CML 和 MRD 的检测具有重要的临床应用价值。

关键词:慢性粒细胞白血病; BCR-ABL mRNA; qPCR; 异基因造血干细胞移植

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.24.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)24-3380-04

Expression and significance of BCR-ABL mRNA in chronic myeloid leukemia patients by qPCR*

CHEN Piji¹, XIE Yiweng¹, HOU Jiaxing¹, CAI Qiaoqing²

(1. People's Hospital of Yantian, Shenzhen, Guangdong 518081, China;

2. Shenzhen Hospital of Beijing University, Shenzhen, Guangdong 518036, China)

Abstract: Objective To investigate the early prediction and monitoring value of real time fluorescence quantitative PCR(qPCR) detection of BCR-ABL mRNA on chronic myelogenous leukemia(CML) patients with minimal residual disease(MRD) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation(allo-HSCT). **Methods** From January 2013 to January 2016 in People's Hospital of Yantian District, School of Medicine in Shenzhen University and Shenzhen Hospital of Peking University, 67 cases of outpatient and hospitalized patients with chronic myelogenous leukemia in the Department of Hematology were selected as the observation group, and 50 healthy people who took physical examination in the People's Hospital of Yantian District at the same period of time were selected as the control group. BCR-ABL mRNA levels before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with chronic myelocytic leukemia were detected by qPCR. **Results** The BCR-ABL mRNA results in the control group were negative. Before transplantation in the levels of BCR-ABL mRNA in patients with CML in accelerated and blastic phase were higher than that in patients in chronic phase($P < 0.05$); After transplantation the BCR-ABL/ABL ratio of qPCR detected at all time points in the first 36 months was significantly lower than that before the transplantation, and the difference was statistically significant($P < 0.05$); qPCR can still detect the level of BCR-ABL/ABL expression after 36 months of transplantation. **Conclusion** qPCR is accurate and reliable, and has important clinical application value for the clinical diagnosis of chronic myeloid leukemia and minimal residual disease detection.

Key words: chronic myeloid leukemia; BCR-ABL mRNA; qPCR; allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

慢性粒细胞性白血病(CML)是具有分子生物学特征的骨髓造血干细胞恶性克隆增生性疾病^[1], CML 发生基因易位会形成 BCR-ABL mRNA, CML 的病理发展中, BCR-ABL mRNA 编码的蛋白对其有重要影响,原因在于其蛋白具有升高酪氨酸激酶活性的作用^[2]。CML 急变期治疗效果差^[3];目前异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)是根治 CML 的唯一方法,可以降低 BCR-ABL mRNA 水平直至检测不到^[4-5]。影响 CML 患者长期生存的主要原因之一是患者 allo-HSCT 后出现复发^[6],因此早期预测并监测患者 allo-HSCT 后体内微小残留病(MRD)的状况,有助于提高患者的治疗疗效,保证患者的健

康。与其他检测 MRD 的方法相比实时荧光定量 PCR(qPCR)有极大地优势。第一,具有较高的灵敏度;第二,检测范围可达 $100 \sim 10^{10}$ copies;第三, TaqMan MGB 探针的应用增加了检测的特异性;第四,操作简便快速,在同一管中完成逆转录、PCR 扩增、产物分析,消除 PCR 扩增产物的携带污染,结果准确^[7-8]。目前国外已有相关研究^[9-10],但国内研究较少,一般集中在融合基因的研究,而对相应的一步法首次发现酶抗污染较少涉及^[11-12]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 1 月至 2016 年 3 月在深圳市盐

* 基金项目:深圳市科技计划项目(JCY20150402092102037)。

作者简介:陈丕绩,男,副主任技师,主要从事临床血液学检验方向研究。

田区人民医院、深圳大学医学院、北京大学深圳医院的门诊和血液科住院的 67 例 CML 患者为观察组,其中男 32 例,女 35 例,年龄 21~44 岁,平均(31.2±3.1)岁。患者白细胞,嗜酸和嗜碱细胞异常升高,脾肿大,骨髓增生异常活跃,BCR/ABL1 融合基因阳性,所有病例根据 FBA 分类标准明确诊断,其中慢性期 51 例,加速期 9 例,急变期 7 例。经 allo-HSCT 治疗,其中骨髓移植(BMT)22 例,外周血干细胞移植(PBSCT)10 例,骨髓移植+外周血干细胞移植 35 例。CML 慢性期患者采用改良的 Bu Cy 方案,加速期、急变期患者采用含全身放射治疗的 Cy TBI 方案。选择同期体检健康者 50 例为对照组,男 26 例,女 24 例,年龄 18~46 岁,平均(32.5±2.9)岁。观察组和对照组无血缘关系,2 组一般资料差异无统计学意义($P < 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 cDNA 合成 采集所有研究对象(观察组患者于 allo-HSCT 治疗前采集)外周血 10 mL 用肝素抗凝,阳性对照为 K562 细胞株(购于中科院上海细胞所),表达 b3a2 型 BCR-ABL mRNA;阴性对照为健康人外周血单个核细胞,不表达 BCR-ABL mRNA,使用 Trizol 试剂盒(购自宝生物工程大连有限公司)并按操作说明提取细胞总 RNA,紫外线分光光度计测定 260、280 nm 波长处的吸光度值,并计算总 RNA 含量,-80 °C 保存。cDNA 合成:反应体系为 20 μL,取 RNA 模板 2 μg,Oligo 1 μL;RNase 抑制剂 1 μL;5×AMV 缓冲液 4 μL,逆转录酶 1 μL;0.1 MDTT 2 μL,dNTP 终浓度为 0.5 mmol/L,经过 65 °C 变性 5 min,37 °C 逆转录 1 h,70 °C 10 min 停止逆转录,合成 cDNA 置于-20 °C 保存备用。

1.2.2 qPCR 反应 采用 TaqMan-MGB 探针法对 BCR-ABL mRNA 和内参基因 ABL 进行 qPCR 检测。实验所用引物和探针由宝生物(大连)工程公司合成。扩增结束后取产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。标准曲线根据标准品的结果绘制,计算 BCR-ABL/ABL 作为该样本 qPCR 的结果,根据标准曲线计算出患者的结果。以上研究所用试剂均购自上海拜力生物科技有限公司。

1.3 检测指标与随访 检测 qPCR 反应的灵敏度、特异度、精密密度以及不同浓度的 UNG 酶防遗留污染的效果。所有 CML 患者经异基因造血干细胞移植治疗后,每 3 个月应用 qPCR 复查 BCR-ABL mRNA 表达,连续观察 3 年,随访截止时间 2016 年 2 月 29 日。

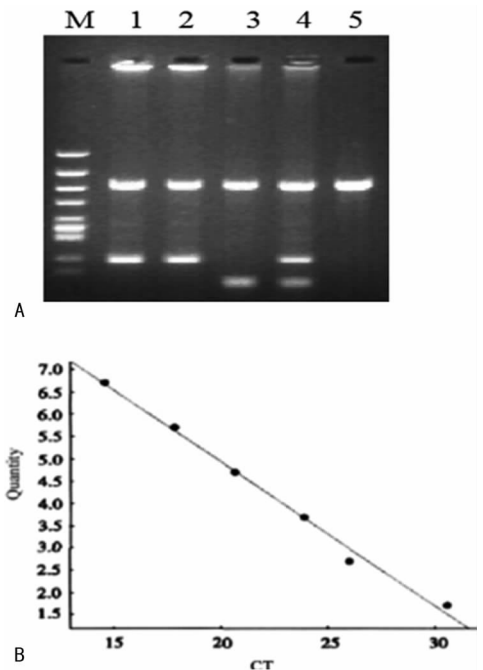
1.4 统计学处理 所有研究数据应用 SPSS20.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析进一步两两比较采用 SNK-9 检验组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 产物电泳图和 qPCR 标准曲线图 BCR-ABL mRNA 的 PCR 产物电泳图见图 1A。qPCR 标准曲线见图 1B,应用质粒标准品作为定量标准模板,将阳性梯度定量模板数与 CT 值关系经对数拟合建立标准曲线。qPCR 法将 CT 值作为检测点,随着模板的减少,CT 值逐渐增大,不同模板对应不同 CT 值。

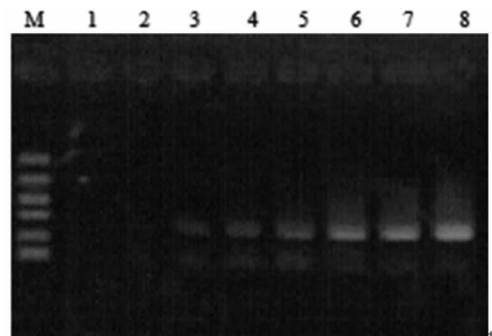
2.2 qPCR 的灵敏度、特异度和精密度的分析 (1)将构建质粒梯度稀释(10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10 copies/μL)作为模板,进行 qPCR 扩增,结果显示该体系检测 BCR-ABL mRNA

的可重复敏感度可达到 10 copies/μL(见图 2)。(2)研究中将 K562 细胞和健康人外周血单个核细胞的标本,提取 RNA 并反转录成 cDNA 后,进行 qPCR 扩增。结果显示,K562 细胞表达 BCR-ABL mRNA 结果均为阳性;健康人外周血单个核细胞结果均为阴性,表明本研究建立 qPCR 的特异性高。(3)阳性质粒按照 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 copies 数等比稀释,同一次稀释后的阳性质粒进行 qPCR 检测,同一次 PCR 扩增时,不同浓度的标准品均设 5 个平行管。日间差分析,标准品 CT 值的变异系数(CV)为 1.9%。日内差分析,标准品 CT 值的变异系数(CV)为 2.3%。(4)以 BCR-ABL mRNA 扩增产物为模板,不同浓度的 UNG 酶防遗留污染的效果比较,在扩增前 0.5 U UNG 酶消除含 dU 的 PCR 扩增产物比 0.2 U 和 1.0 U UNG 酶均多,0.5 U UNG 酶为 qPCR 反应中的最佳浓度。



注:A 图中,M 表示 DNA marker;1 表示阴性对照;2 表示 b3a2 型和 b2a2 型患者;3 表示 b2a2 型的 CML 患者;4 表示 b3a2 型患者;5 表示 b3a2 型患者

图 1 BCR-ABL mRNA 的 PCR 产物电泳图 (A) 和 qPCR 标准曲线图 (B)



注:M 为 marker;1~8 分别为 100、101、102、103、104、105、106、107。

图 2 灵敏度检测电泳图

2.3 CML 不同病期 BCR-ABL mRNA 基因表达的比较 对照组检测 BCR-ABL mRNA 基因表达均为阴性。CML 患者 BCR-ABL mRNA 水平,随病期的进展逐渐增高,加速期和急

变期的 BCR-ABL mRNA 水平明显高于慢性期,差异有统计学意义($P < 0.05$);急变期与加速期差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 2 观察组和对照组 BCR-ABL mRNA 基因表达的比较

CML 病期	n	BCR-ABL mRNA (Copies/ μ g totalRNA)	BCR-ABL/ABL(%)
慢性期	51	10 526 \pm 5 321	11.25 \pm 5.42
加速期	9	73 046 \pm 7 456	86.21 \pm 3.45
急变期	7	86 516 \pm 9 894	90.12 \pm 4.35

2.4 异基因造血干细胞移植后 qPCR 检测结果 67 例异基因造血干细胞移植患者移植前 BCR-ABL mRNA 为阳性,移植后不同时间 BCR-ABL mRNA 较移植前显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。移植 12 月内,随访患者 BCR-ABL mRNA 定量结果全部转阴,与 12~24 月结果差异有统计学意义($P < 0.05$)。24 月后随访 12 例患者,10 例 BCR-ABL mRNA 仍为阴性,2 例复发。移植 36 个月后,qPCR 仍然能检测出 BCR-ABL/ABL(见表 3)。

表 3 异基因造血干细胞移植后 qPCR 检测结果($\bar{x} \pm s$)

时间	n	qPCR
移植前	67	0.763 5 \pm 0.106 7
0~3 月	64	0.010 1 \pm 0.001 9
3~9 月	58	0.006 4 \pm 0.001 2
9~12 月	34	0.005 6 \pm 0.001 0
12~24 月	21	0.004 5 \pm 0.000 7
24~36 月	12	0.000 8 \pm 0.000 3
36 月	8	0.000 2 \pm 0.000 1

3 讨 论

qPCR 的优点在于逆转录、扩增反应及产物分析在同一个管中完成,消除了交叉污染,且结果的可重复性好,敏感可靠,操作简便、快速,对临床治疗具有指导意义^[13-14]。造血干细胞移植或异基因骨髓移植是目前能根治 CML 唯一的方法,但针对骨髓移植后的 MRD 的监测尤为重要,其引起的肿瘤细胞复发会导致治疗失败^[15];所以,对 MRD 的监测,能判断早期复发并及早进行干预治疗具有重要的意义。qPCR 监测 MRD 的灵敏度比常规检测手段高,对监测 CML 移植后的 MRD 具有重要意义。本研究应用自行研制的 BCR-ABL mRNA 基因 qPCR 试剂盒,qPCR 体系检测 BCR-ABL mRNA 的可重复灵敏度可达到 10 copies/ μ L,且 TaqMan MGB 探针的应用增加了检测的特异度,并且一步检测,UNG 酶抗污染,日间差分析,精密度(CV)为 1.9%。日内差分析,精密度(CV)为 2.3%。检测结果表明 CML 加速期和急变期患者 BCR-ABL mRNA 的水平明显高于慢性期,说明 qPCR 可作为 CML 诊断和病期分类的指标之一。Neumann 等^[16]在研究中也表明初治的不同病期的 CML 患者用 qPCR 法测得的 BCR-ABL mRNA 水平有很大差异。CML 患者行异基因造血干细胞移植 12 个月内,BCR-ABL mRNA 定量结果全部转阴,24 月后随访 12 例患者,10 例 BCR-ABL mRNA 仍为阴性,2 例复发。移植 36 个月后,qPCR 仍然能检测出 BCR-ABL/ABL 的表达水平。提示了

qPCR 方法可用于 allo-HSCT 术后 MRD 监测。Elmaagacli 等^[17]也在研究中表明 BCR-ABL mRNA 水平在不同病期差异有统计学意义($P < 0.05$)。

综上所述,qPCR 检测 BCR-ABL mRNA 具有灵敏、特异、精密、检测范围宽、结果准确和操作简便、快速 UNG 酶抗污染等优点,可作为 CML 诊断、预后和 MDR 检测灵敏可靠的方法,具有一定的临床价值,值得医院推广应用。

参考文献

- [1] Eiring AM, Page BD, Kraft IL, et al. Combined STAT3 and BCR-ABL1 inhibition induces synthetic lethality in therapy-resistant chronic myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2015,29(3):586-597.
- [2] Gui X, Zhang Y, Pan J, et al. Chronic myeloid leukemia with e14a3 BCR-ABL transcript; analysis of characteristics and prognostic significance [J]. *Leuk Lymphoma*, 2015,56(12):3343-3347.
- [3] 谭大为,郑方,童晓丽,等. 达沙替尼治疗伊马替尼耐药的急变期慢性粒细胞白血病 1 例报道[J]. *重庆医学*, 2015, 44(35):5039-5040.
- [4] 许兰平,马艳茹. 酪氨酸激酶抑制剂在异基因造血干细胞移植治疗慢性髓性白血病中的应用[J]. *中华血液学杂志*, 2014,35(2):94-95.
- [5] 许兰平,马艳茹. 酪氨酸激酶抑制剂在异基因造血干细胞移植治疗慢性髓性白血病中的应用[J]. *中华血液学杂志*, 2014,35(2):94-95.
- [6] 段雨娟,冷亚美,杨波,等. 慢性粒细胞白血病患者健康相关生存质量及自我管理的研究进展[J]. *中华现代护理杂志*, 2014,20(7):763-765.
- [7] Schnittger S, Bacher U, Kern W, et al. qPCR based WT1 expression in comparison to BCR-ABL quantification can predict Philadelphia negative clonal evolution in patients with imatinib-treated chronic myeloid leukaemia[J]. *Br J Haematol*, 2009,146(6):665-668.
- [8] 姚利,陈子兴,岑建农,等. 实时定量逆转录 PCR 在白血病标志物检测中的应用[J]. *临床检验杂志*, 2007,25(3):212-214.
- [9] Yagasaki F, Niwa T, Abe A, et al. Correlation of quantification of major bcr-abl mRNA between TMA(transcription mediated amplification) method and real-time quantitative PCR[J]. *Rinsho Ketsueki*, 2009,50(6):481-487.
- [10] 孟文彤,贾永前,黄纯兰. 一步法 qPCR 检测慢性粒细胞白血病 BCR-ABL 融合基因[J]. *华西医学*, 2004,19(2):224-225.
- [11] 郑慧丽,于慧洋,许霁虹,等. 实时定量 PCR 检测白血病融合基因的应用研究[J]. *中华全科医学*, 2011,9(7):1126-1128.
- [12] Pigazzi M, Manara E, Buldini B, et al. Minimal residual disease monitored after induction therapy by qPCR can contribute to tailor treatment of patients with t(8;21) RUNX1-RUNX1T1 rearrangement [J]. *Haematologica*, 2015,100(3):99-101.

LPS 是常见的抗原,也是引起 ALI 常见的原因之一。本研究采用 LPS 对大鼠进行尾部静脉注射,以完成 ALI 的造模。脂肪酸在机体内环境的维持中具有重要的作用,研究表明,脂肪酸可调节细胞膜的流动性,并对细胞间信号的传导产生影响^[10]。SOD 是一种新型酶制剂,能有效清除人体代谢过程中产生的有毒物质,其中包括氧自由基,因此被称为人体清道夫^[11-12]。MDA 是常用的膜脂过氧化指标,同时也能有效反映组织损伤程度。ICAM-1 是常见的细胞间黏附分子之一,具有刺激中性粒细胞与内皮细胞黏附的作用,同时减少中性粒细胞的聚集。TLR4 蛋白是炎性激活过程中重要通路,具有刺激炎症因子释放,加重急性肺损伤的作用。TNF- α 是常见的炎症因子,在炎症的发生发展中具有重要的作用,体外实验表明其具有刺激 IL-1 表达的作用^[13]。LPS 对于 TNF- α 具有极强的刺激作用,为此,本研究将 TNF- α 作为观察指标,以探究 PUFA 对 ALI 患者炎症反应的影响。

本研究中,随着处理时间的进行,但观察组大鼠 SOD 水平降低程度、MDA、ICAM-1 水平升高程度明显低于对照组,此结果表明,PUFA 能有效降低 ALI 大鼠氧化应激水平,Endo 等^[14]也在研究中发现,多不饱和脂肪酸具有稳定细胞膜稳定性的作用,同时减少氧化应激对组织的损伤作用,可能与其调节膜的流动性有关。2 组大鼠处理前后 TNF- α 水平和 TLR4 相对表达量变化表明,PUFA 能有效抑制 TLR4 蛋白及 TNF- α 的表达,从而降低炎症反应程度, Tokarik 等^[15]也在研究中发现,PUFA 能有效降低大鼠肺部炎症反应,可能与 PUFA 阻碍信号通路的活化有关。

综上所述,PUFA 能有效降低 LPS 致 ALI 大鼠的氧化应激反应及炎症水平,可能有助于 ALI 的治疗。

参考文献

- [1] 谷志龙,姜华茂,胡占升,等. LPS 诱导小鼠急性肺损伤 TLR4 及 TNF- α 表达[J]. 中国医学创新,2015,12(24):16-19.
- [2] 文秀芳,陈霞,邹海桥,等. 姜黄素通过抑制 TLR4 信号通路下调脂多糖诱导的肺巨噬细胞分泌 TNF- α 、IL-6 和 IL-8[J]. 云南中医学院学报,2013,14(6):22-25.
- [3] 陈文,王沛明,张祎,等. 基于 TLR4 通路初探黄芩对内毒素血症大鼠肝肺组织中细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 以及氧化应激因子 MDA、SOD 水平的影响[J]. 中药物理与临床,2016,15(3):87-92.
- [4] 杜西翠,刘佳龙,杨柳,等. LPS 介导小鼠子宫内皮细胞中 TLR4/NF- κ B 信号通路的研究及槲皮素的影响[A]. 中国畜牧兽医学中兽医学分会 2013 年学术年会论文集[C]. 2013.
- [5] 黄继义,刘才文,林建东,等. 内毒素急性肺损伤 TLR4-LPS 信号传导对 NF- κ B 活性的影响[J]. 临床肺科杂志,2014,19(2):223-226.
- [6] 赵艳,柳欣欣,郭丹,等. ω -3 多不饱和脂肪酸对内毒素致大鼠急性肺损伤的影响[J]. 中华临床营养杂志,2013,21(2):83-89.
- [7] Yamasawa H, Ishii Y, Kitamura S. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant in a rat model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. [J]. Inflammation,1999,23(3):263-274.
- [8] 谢慧,张京臣,陈莹,等. ω -3 多不饱和脂肪酸对兔急性肺损伤的保护作用[J]. 中华临床营养杂志,2014,22(5):297-301.
- [9] 王蓉,高德伟,唐云,等. ω -3 脂肪酸对于老年急性肺损伤机械通气患者的肺保护作用[A]. 第六届全国“老年疾病营养支持的循证应用”学术研讨会论文集[C]. 2013.
- [10] Li Li, Weijing W, Wenjie H, et al. NF- κ B RNAi decreases the Bax/Bcl-2 ratio and inhibits TNF- α -induced apoptosis in human alveolar epithelial cells[J]. Inflamm Res,2013,62(4):387-397.
- [11] 孙威,武庆平. 多不饱和脂肪酸衍生物对急性肺损伤的保护作用研究进展[J]. 国际麻醉学与复苏杂志,2013,34(11):1038-1042.
- [12] 王亿胜. ω -3 多不饱和脂肪酸对 ALI/ARDS 的治疗作用及其机制[D]. 郑州:郑州大学,2014.
- [13] 叶家欣,葛敏. ω -3 多不饱和脂肪酸在主动脉夹层术后急性肺损伤治疗中的应用[J]. 中国临床研究,2016,29(6):756-759.
- [14] Endo S, Shibata S, Sato N, et al. A prospective cohort study of ALI/ARDS in the Tohoku district of Japan(second report)[J]. J Anesth,2010,24(3):351-358.
- [15] Tokarik M, Sjöberg F, Vajtr D, et al. Natriuretic peptide proANP(1-98), a biomarker of ALI/ARDS in burns[J]. Burns,2013,39(2):243-248.

(收稿日期:2017-05-18 修回日期:2017-08-07)

(上接第 3382 页)

- [13] 江梅. qPCR 技术检测白血病融合基因及其临床应用[J]. 实验与检验医学,2010,28(5):469-472.
- [14] 黄晓军. 构建移植后复发防治的综合体系[J]. 中华内科杂志,2014,53(2):81-83.
- [15] Neumann F, Herold C, Hildebrandt B, et al. Quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction for diagnosis of BCR-ABL positive leukemias and molecular monitoring following allogeneic stem cell transplantation[J]. Eur J Haematol,2003,70(1):1-10.
- [16] Elmaagacli AH, Beelen DW, Opalka B, et al. The amount of BCR-ABL fusion transcripts detected by the real-time quantitative polymerase chain reaction method in patients with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia correlates with the disease stage[J]. Ann Hematol,2000,79(8):424-431.

(收稿日期:2017-05-12 修回日期:2017-08-01)