

Notch1 基因检测对不同分型急性髓系白血病的诊断价值*

王方平, 张平安[△], 邓亚云, 吴 薇(武汉大学人民医院检验科 430060)

【摘要】 目的 研究不同分型的急性髓系白血病(AML)患者骨髓中单个核细胞 Notch1 基因 mRNA 的表达。**方法** 收集初诊的 102 例 AML 患者(M₁ 型 18 例, M₂ 型 41 例, M₃ 型 16 例, M₄ 型 14 例, M₅ 型 13 例)和 34 例对照者(非白血病和健康人, 其中非白血病患者和健康人 Notch1 基因 mRNA 表达无差异)骨髓, 采用实时荧光定量聚合酶链反应检测 Notch1 基因 mRNA 表达情况。**结果** 102 例 AML 患者骨髓中 Notch1 基因 mRNA 表达量相对于对照组升高了 477.7 倍, 差异有统计学意义($t=51.0, P<0.05$)。不同分型 AML 患者骨髓中, M₁、M₂、M₄、M₅ 型 AML 之间 Notch1 基因 mRNA 表达量无差异, 但均低于 M₃ 型, 与 M₃ 差异有统计学意义($t=4.87, 5.24, 3.26, 5.75, P<0.05$)。**结论** 不同分型的 AML 患者骨髓 Notch1 基因表达均存在异常, 并且发现 M₃ 型与其他类型 AML 表达有差异, 该机制可能表明 Notch1 基因在不同亚型 AML 发生和发展中所起作用不同。

【关键词】 急性髓系白血病; 骨髓单个核细胞; Notch1 基因; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.24.003 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)24-3617-03

Study on the diagnostic value of Notch1 mRNA in different subtypes of acute myelocytic leukemia patients* WANG

Fang-ping, ZHANG Ping-an[△], DENG Ya-yun, WU Wei (Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

【Abstract】 Objective To explore the expression of Notch1 mRNA of mononuclear cells in marrow of patients with different subtypes of acute myelocytic leukemia (AML). **Methods** Marrow samples were respectively collected from 102 cases of newly diagnosed patients with AML (AML group, including 18 cases of M₁, 41 cases of M₂, 16 cases of M₃, 14 cases of M₄ and 13 cases of M₅) and 34 cases of controls (control group, including non-hematopathy patients and healthy individuals, who had similar expression levels of Notch1 mRNA). Expression levels of Notch1 mRNA were detected by real-time quantitative PCR. **Results** Comparing with control group, the expression level of Notch1 mRNA of AML group increased by 477.7 times, and was significantly higher than that of control group ($t=51.0, P<0.05$). There were no differences of the expression levels of Notch1 mRNA among the patients with M₁, M₂, M₄ and M₅ leukemia ($P>0.05$), however, they were significantly lower than that of the patients with M₃ leukemia, with statistical differences ($t=4.87, 5.24, 3.26, 5.75, P<0.05$). **Conclusion** AML patients had abnormal expression of Notch1 gene in marrow, and the expression level of Notch1 gene in M3 leukemia patients were significantly different from the patients with other subtypes of AML, which indicated that Notch1 mRNA plays different roles in different subtypes of AML.

【Key words】 acute myelocytic leukemia; bone marrow mononuclear cells; Notch1; PCR

急性髓系白血病(AML)全世界的发病率为 2.25/10 万人, 我国发病率为 5.68/10 万人, 是成年人最常见的急性白血病^[1]。目前 AML 的治疗仍以化疗为主, 但化疗药物的耐受及化疗缓解后复发仍然是治疗的主要障碍, 因此迫切需要寻求新的治疗方法。Notch 基因是一个由细胞外亚基 NEC(NEC)和跨膜亚基 NTM(ICN)组成的二聚体跨膜受体, 哺乳动物体内表达 4 种 Notch 受体, 5 种 Notch 配体^[2]。配体结合到受体, 引起 γ 分泌酶切割掉细胞外亚基 NEC, 并释放出细胞内亚基 ICN^[3]。释放出的 ICN 转移到细胞核内, 诱导相关致癌基因的表达^[2]。近年来, 关于 Notch 信号通路在恶性白血病中的报道充满争议, Lobry 等^[4]和 Kannan 等^[5]研究表明, Notch 信号通路的活化能抑制 AML 患者细胞的生长。但 Kode 等^[6]认为, 成骨细胞中活化的 β 链蛋白激活刺激 Jagged1 的表达, 随后激

活 Notch 基因在造血干细胞中表达, 最终导致 AML 发生。上述研究表明, Notch 基因可能具有致癌与抑癌的双重作用, 这可能是由于组织来源不同、肿瘤发展阶段差异及疾病属于不同亚型等导致^[7]。因此, 本研究收集患者骨髓细胞, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术检测不同分型 AML 患者骨髓单个核细胞中 Notch1 基因 mRNA 的表达量, 探讨 Notch1 基因与 AML 不同分型之间的关系, 为不同分型 AML 白血病的诊断及预后评估提供理论依据, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 6 月至 2015 年 5 月以形态学、免疫学、遗传学和分子生物学诊断标准确诊为 AML 的 102 例初诊患者骨髓标本作为 AML 组, 其中男 52 例, 女 50 例。根据 FAB 分型标准将 AML 分为 M₁ 型 18 例, M₂ 型 41 例, M₃

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81200389)。

作者简介:王方平,女,硕士,检验医师,主要从事免疫学检验研究。△ 通讯作者, E-mail:zhangpingan@aliyun.com。

型 16 例, M₁ 型 14 例, M₃ 型 13 例。以 34 例非 AML 白血病患者和健康人骨髓作为对照组。

1.2 试剂与仪器 Trizol 和 SYBR Premix Ex Taq II 由 TaKaRa 公司提供, 反转录试剂盒由 Thermo SCIENTIFIC 公司提供。PCR 分析仪由 Applied Biosystem Inc 公司生产, VII7

荧光定量 PCR 分析仪由 ABI 公司生产。

1.3 研究方法

1.3.1 引物设计 利用美国国立生物技术信息中心网站中提供的 Notch1 mRNA 序列和 BLAST 进行引物设计, 见表 1。所有引物均由上海维基生物科技有限公司合成。

表 1 基因 Notch1、β-actin 的上、下游引物

目的基因	上游引物(5'~3')	下游引物(5'~3')	引物长度(bp)
Notch1(NM_017617)	CGACGCACAAGGTGTCTTCCA	CGGACTTGCCCAAGGTCATCTAC	179
β-actin(NC_000007.14)	AGCGAGCATCCCCAAAGTT	GGGCACGAAGGCTCATCATT	285

1.3.2 mRNA 提取和反转录 采集研究对象骨髓 2 mL 于 EDTA 抗凝试管中, 按照淋巴细胞分裂液说明书(天津美德太平洋科技有限公司)提取单个核细胞。Trizol 法提取总 mRNA 并将其进行纯度分析, 当 A_{260 nm}/A_{280 nm} 为 1.8 时方可用于下一步研究。取 11 μL RNA 模板进行反转录, 加入 1 μL oligo 引物混匀并瞬时离心, 65 °C 5 min, 反应体系: 4 μL Reaction Buffer, 2 μL Mix, 1 μL RI, 1 μL RT。反应条件: 42 °C 60 min, 72 °C 10 min, 4 °C 保存。得到的 cDNA 产物置于 -20 °C 保存备用。

1.3.3 荧光定量 PCR 检测 反应体系为 cDNA 1 μL, 上、下游引物各 1 μL, SYBR Premix Ex Taq II 10 μL, ROX II 0.4 μL, ddH₂O 7.6 μL, 总体积 20 μL。2 个基因(Notch1、β-actin)的扩增反应条件均为 94 °C 30 s 预变性, 94 °C 20 s, 60 °C 20 s, 72 °C 35 s, 50 个循环。溶解曲线条件: 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。对 AML 各组及 AML 组和对照组基因 mRNA 的表达采用目标扩增产物达到设定阈值所经历的循环次数(Ct)值进行比较。扩增效率验证: 本研究分别对 Notch1 和 β-actin 基因进行 10 倍稀释, 稀释 5 种梯度, 目的基因和内参基因扩增效率相差小于 5%, 且在 98%~102%, 可以认为扩增效率近似相等。

1.4 统计学处理 实时定量 PCR 结果由荧光定量分析仪自动采集并给出目的基因和内参基因的 Ct 值, 基因表达量采用 AML 组及对照组用 2^{-ΔΔCt}[8] 表示, 式中 ΔΔCt = ΔCt_{AML组} - ΔCt_{对照组}[8], AML 组及对照组 ΔCt = Ct_{目的} - Ct_{内参}[8]。采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。Notch1 和 β-actin 基因 mRNA 表达量以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数间比较采用方差分析。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实时荧光定量 PCR 分析 Notch1 表达 以 cDNA 作为模板, 进行实时 PCR 扩增, 制作标准曲线和溶解曲线。结果表明, Notch1 及 β-actin 溶解曲线只有单一峰。琼脂糖凝胶电泳图可以看出目的条带单一, 见图 1, 而且目的基因片段的长度与预期设计的长度符合, 说明引物特异性较好。Notch1 及 β-actin 的标准曲线及二者的扩增效率分别为 98%、102%, 可以认为二者扩增效率近似相等。

2.2 AML 组与对照组 Notch1 基因 mRNA 表达情况 对实验组和对照组 Notch1 基因 mRNA 的表达进行检测发现, AML 患者组 Notch1 mRNA 表达高于对照组, 差异有统计学意义(P < 0.05), 且 M₃ 与 M₁、M₂、M₄ 型、M₅ 型之间 Notch1

mRNA 表达水平差异有统计学意义(P < 0.05), 见表 1、2。

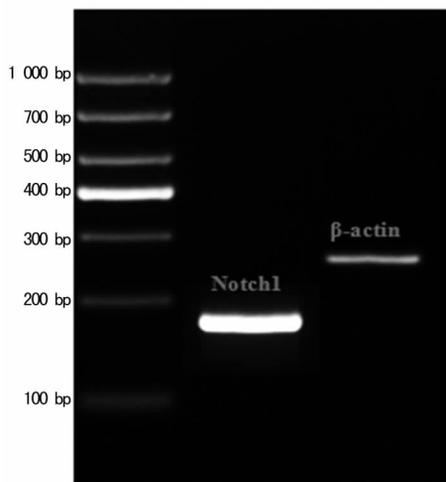


图 1 琼脂糖凝胶电泳图

表 1 不同分型 AML 组和对照组之间 Notch1 mRNA ΔCt 值

组别	Mean ± S	ΔΔCt	2 ^{-(ΔΔCt)}	P
ΔCt(Notch1)				
AML-M ₁	7.7 ± 0.9	-8.7	415.9	0.05
AML-M ₂	7.6 ± 0.9	-8.8	445.7	0.05
AML-M ₃	6.4 ± 0.6	-10.0	1024	0.05
AML-M ₄	7.3 ± 0.5	-9.1	548.7	0.05
AML-M ₅	8.1 ± 0.6	-8.3	315.2	0.05
AML	7.5 ± 0.9	-8.9	477.7	0.05
Control	16.4 ± 0.8	-	-	-

注: ΔΔCt = ΔCt_{AML组} - ΔCt_{对照组}。

表 2 不同分型患者组之间 Notch1 mRNA ΔCt 值两两比较

组别	\ΔΔCt	2 ^{\ΔΔCt}	t	P
ΔCt(Notch1)				
M ₁ M ₂	0.10	1.07	0.45	0.05
M ₁ M ₃	1.32	2.50	4.87	0.05
M ₁ M ₄	0.38	1.30	1.35	0.05
M ₁ M ₅	0.37	1.29	1.29	0.05
M ₂ M ₃	1.22	2.33	5.24	0.05
M ₂ M ₄	0.28	1.21	1.15	0.05

续表 2 不同分型患者组之间 Notch1 mRNA Δ Ct 值两两比较

组别	$ \Delta\Delta Ct $	$2^{ \Delta\Delta Ct }$	t	P
M ₂ M ₅	0.47	1.39	1.88	0.05
M ₃ M ₄	0.94	1.92	3.26	0.05
M ₃ M ₅	1.69	3.23	5.75	0.05
M ₄ M ₅	0.75	1.68	2.47	0.05

注： $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct M_N - \Delta Ct M_M (N > M)$ 。

3 讨 论

Notch 基因在细胞生长发育过程中起关键作用,参与多系统干细胞自我更新和分化,而且 Notch 信号传导失调在血液恶性肿瘤和其他各种实体肿瘤中都有报道^[9-10]。Notch 基因广泛参与肿瘤细胞的信号调节,在 T 细胞淋巴瘤、宫颈癌中,活化的 Notch 基因起致癌作用^[11-12]。而在神经胶质瘤中它又是一种肿瘤抑制剂^[13]。研究发现,白血病的发生与 Notch 基因及其介导的信号传导通路密切相关,Notch 信号参与调节淋巴细胞成熟的多个阶段,在 T 急性淋巴细胞白血病中 Notch1 信号通路的分子机制不明,突变的 Notch1 基因可能与其他多种致癌因子共同作用^[14]。

FAB 分型是根据骨髓细胞形态学和细胞化学特征,尤其是原始细胞的数量和形态来分型,一共分为 M₀ ~ M₇ 8 型,其中 M₃ 型白血病又叫急性早幼粒性白血病,具有特殊的临床表现、形态特征,以及区别于其他亚型的基因特征。近来 Grieselhuber 等^[15]报道,初期的急性早幼粒性白血病(APL)骨髓标本与其他 AML 亚型相比较 Jagged1 表达量较高,在细胞系水平诱导 PML-RARA 的表达提高了 Jagged1 蛋白表达水平,从而加强了 γ 分泌酶切割细胞外亚基 NEC,Notch 抑制剂能减少 APL 细胞的生长,这表明活化的 Notch 基因可能在 APL 中扮演着致癌角色。 γ 分泌酶抑制剂(GSI)可通过抑制 Notch 基因受体或配体抑制 Notch 基因活性^[3]。因此,Notch 基因抑制剂是一种非常有前途的抑癌剂,用来治疗某些癌症,如 APL 和急性淋巴细胞性白血病等^[3]。

本研究发现,Notch1 基因不仅在健康人与 AML 患者单核细胞内表达显著不同,升高了 477.7 倍($t=51.0, P < 0.05$),而且在不同 FAB 分型的 AML 中表达也有差异。其中 M₃ 型比 M₁、M₂、M₄ 及 M₅ 型表达量高,差异有统计学意义($P < 0.05$),这可为临床诊断及治疗 M₃ 型 AML 提供辅助依据。

目前 Notch 基因抑制剂作为一种前瞻性治疗药物,已经有了较为深入的研究,以上研究为利用 GSI 治疗不同分型 AML 提供了一定的指导作用。

参考文献

[1] 刘玉琴,赵凤菊,陈万青,等. 中国 2009 年白血病发病和死亡资料分析[J]. 中国肿瘤,2013,22(7):528-534.
 [2] Tohda S. NOTCH signaling roles in acute myeloid leukemia cell growth and interaction with other stemness-relat-

ed signals[J]. Anticancer Res,2014,34(11):6259-6264.
 [3] Tohda S,Nara N. Expression of Notch1 and Jagged1 proteins in acute myeloid leukemia cells[J]. Leuk Lymphoma,2001,42(3):467-472.
 [4] Lobry C, Ntziachristos P, Ndiaye-Lobry D, et al. Notch pathway activation targets AML-initiating cell homeostasis and differentiation[J]. J Exp Med,2013,210(2):301-319.
 [5] Kannan S, Sutphin RM, Hall MG, et al. Notch activation inhibits AML growth and survival;a potential therapeutic approach[J]. J Exp Med,2013,210(2):321-337.
 [6] Kode A, Manavalan JS, Mosialou I, et al. Leukaemogenesis induced by an activating catenin mutation in osteoblasts[J]. Nature,2014,506(7487):240-244.
 [7] Espinoza I, Miele L. Notch inhibitors for cancer treatment [J]. Pharmacol Ther,2013,139(2):95-110.
 [8] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. Nucleic Acids Res, 2001,29(9):45-50.
 [9] Bigas A, Espinosa L. Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be[J]. Blood,2012,119(14):3226-3235.
 [10] Ntziachristos P, Lim JS, Sage J, et al. From fly wings to targeted cancer therapies:a centennial for notch signaling [J]. Cancer Cell,2014,25(3):318-334.
 [11] Yousif NG, Sadiq AM, Yousif MG, et al. Notch1 ligand signaling pathway activated in cervical cancer: poor prognosis with high-level JAG1/Notch1 [J]. Arch Gynecol Obstet,2015,292(4):899-904.
 [12] Yang L, Zhang S, George SK, et al. Targeting Notch1 and proteasome as an effective strategy to suppress T-cell lymphoproliferative neoplasms [J]. Oncotarget, 2015, 6 (17):14953-14969.
 [13] Yao J, Zheng K, Li C, et al. Interference of Notch1 inhibits the growth of glioma cancer cells by inducing cell autophagy and down-regulation of Notch1-Hes-1 signaling pathway[J]. Med Oncol,2015,32(6):174-182.
 [14] Weerkamp F, van Dongen JJ, Staal FJ. Notch and Wnt signalling in T-lymphocyte development and acute lymphoblastic leukemia [J]. Leukemia, 2006, 20 (7): 1197-1205.
 [15] Grieselhuber NR, Klco JM, Verdoni AM, et al. Notch signaling in acute promyelocytic leukemia [J]. Leukemia, 2013,27(7):1548-1557.

(收稿日期:2015-06-19 修回日期:2015-08-10)