

染色体核型和 bcr/abl 融合基因表达与慢性髓细胞白血病急变的关系

李正发¹⁾, 邓明倩²⁾, 沈晓梅¹⁾, 朱宝生¹⁾, 唐新华¹⁾, 史克倩¹⁾, 章印红¹⁾

(1) 云南省第一人民医院血液科, 细胞遗传室, 云南 昆明 650032; 2) 昆明市盘龙区疾控中心, 云南 昆明 650011)

[摘要] **目的** 探讨慢性髓细胞白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) 的细胞遗传学特性及其与病程发展的关系. **方法** 短期培养法直接法 G 显带检测 CML 的骨髓染色体核型, 双色荧光原位杂交检测 CML 的 bcr/abl 融合基因, 统计学方法采用 *t* 检验. **结果** 264 例 CML 患者的骨髓染色体检测, 检测出 Ph 染色体阴性 14 例, 阴性率 5.3%, 其余为 Ph 染色体阳性, 阳性率为 94.7%. 在观察到 CML 急变的 43 例患者中, 标准 Ph 染色体 22 例, Ph 染色体阴性 9 例, 双 Ph 染色体 2 例, 变异 Ph 染色体 3 例, 标准 Ph 染色体伴其它染色体易位 3 例, Ph 染色体阴性伴其它染色体易位 1 例, Ph 染色体阴性伴倒位 2 例, Ph 染色体阳性伴倒位 1 例. 43 例患者中 24 例患者急变时发生了染色体核型及融合基因改变, 19 例患者染色体核型及融合基因没有发生变化; [t(9;22)(q11;34)] 的 CML 患者与 [Ph-, 变异 Ph, 复杂染色体] 的 CML 患者急变时间 (月) 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). **结论** (1) 慢性髓细胞性白血病加速 / 急变期发生克隆演化; (2) [Ph-, 变异 Ph, 复杂染色体] 的 CML 患者急变时间 (月) 明显短于 [t(9;22)(q11;34)] 的 CML 患者; (3) 染色体核型和 bcr/abl 融合基因表达可为诊断提供可靠、可循的依据, 对预后判断有重要意义.

[关键词] 慢性髓性白血病; 染色体核型; bcr/abl 融合基因

[中图分类号] R392.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 01 - 0012 - 04

The Relation of Karyotype and bcr/abl Fusion Gene with the Blast Crisis of Chronic Myeloid Leukemia

LI Zheng - fa¹⁾, DENG Ming - qian²⁾, SHEN Xiao - mei¹⁾, ZHU Bao - sheng²⁾, TANG Xin - hua²⁾,
SHI Ke - qing¹⁾, ZHANG Yin - hong¹⁾

(1) Dept. of Hematology, Cytogenetics Room, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650032; 2) Panlong District Center of Disease Prevention and Control, Kunming Yunnan 650011, China)

[Abstract] **Objective** To explore the relation of chronic myeloid leukemia cytogenetic characteristics and disease development. **Methods** Direct short-term culture gbanding was used to detect the of karyotype of bone marrow chromosome in CML patients. Two-color fluorescence in situ hybridization was used to detect the bcr/abl fusion genes in CML patients. *t* test was used to statistically analyze the data. **Results** In the 264 cases of CML patients with bone marrow chromosomal testing, Ph negative chromosome was detected in 14 cases, the negative rate was 5.3%, the remaining cases were Ph positive chromosome and variation of ph chromosome, the positive rate was 94.7%. In 43 CML patients in blast crisis period, standard Ph chromosome was found in 22 cases, Ph negative chromosome in 9 cases, double Ph chromosome in 2 cases, the variation of Ph chromosome in 3 cases, standard Ph chromosome with other dasypyrum in 3 cases, Ph negative chromosome with other dasypyrum in 1 case, Ph negative chromosome with inversion in 2 cases, Ph positive chromosome with inversion in 1 case. Karyotype and fusion gene change occurred in 24 of 43 patients in blast crisis, and 19 cases had no change in the karyotypical chromosomes and

[基金项目] 云南省自然科学基金资助项目 (94C038Q; 云南省人民医院科研基金资助项目, 2003YK011)

[作者简介] 李正发 (1967~), 男, 云南鲁甸县人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事血液淋巴系统疾病临床治疗研究工作.

the fusion gene. *t* test showed that there was significant differences in acceleration/blast crisis time (month) among patients CML patients with standard Ph chromosome, Ph negative chromosome and variation of Ph chromosome. ($P < 0.01$). **Conclusions** (1) Cloning evolution occurred in 55.8% of patients with chronic myeloid leukemia in acceleration/blast crisis period. (2) The acceleration/blast crisis period of CML patients with Ph negative, Ph variant and complex chromosome was shorter than that of CML patients with t [(9;22) (q11;34)]. (3) The CML cell heredity not only provide a reliable evidence for the diagnosis, and also plays an important role in the prognosis of CML.

[**Key words**] Chronic myelogenous leukemia; Karyotype; Bcr/abl fusion gene

费城染色体 (philadelphia chromosome, Ph- ; [t (9;22) (q11;34)]) 是慢性髓细胞性白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 在细胞遗传学上的特征性改变, 分子细胞遗传学可检测 bcr/abl 融合基因, Ph 染色体阳性是 CML 诊断的重要指标之一. 典型的 Ph 染色体 [t(9;22)(q11;34)] 被认为导致 bcr/abl 融合基因的产生, 是 CML 的始动突变. CML 在病程演变中分慢性期、加速期、急变期. 加速期、急变期是 CML 预后的分水岭, 那么 Ph 染色体阴性和 / 或变异的 Ph 染色体的 CML 患者中是否存在 bcr/abl 融合基因, 他们与 Ph 染色体阳性的 CML 患者在临床及预后上是否存在差异值得探讨. 笔者以 CML 初诊病例全程发展为观察对象, 对药物治疗、干细胞移植治疗前后染色体核型改变及基因表达进行研究, 探索其恶性克隆演化现象, 并探讨其与急变时间的关系.

1 材料与方法

1.1 病例资料

观察云南省第一、第二人民医院血液科 1998 年 1 月至 2008 年 2 月收治的 CML 患者 294 例, 观察至 2008 年 2 月, 发生急变 (chronic myeloid leukemia-blast crisis, CML-BC) 的患者 43 例, 骨髓细胞培养收获可供分析的细胞分裂相, 临床资料可供研究, 年龄 10~73 岁, 中位年龄 36 岁. 初诊和 / 或治疗前后采骨髓标本由血液科临床医生采集, 血液细胞室和细胞遗传室提供专用抗凝管瓶, 检验医生处理骨髓标本、涂片制作.

1.2 方法

1.2.1 骨髓标本处理 无菌条件下抽取骨髓 0.5~0.8 mL, 分 2 份加入含 20% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中, 于 37 °C 静置培养. 其中 1 瓶在培养 2 h 后按 Williams 直接制片法制片, 另 1 瓶按 Yunis 短期培养同步化方法制片. 染色体标本经 37 °C 恒温干燥 24 h 后, 用胰蛋白酶-Giemsa 法显带. 染

色体分析和描述按国际染色体命名体制进行. 骨髓 1 滴涂在载玻片中央 (稍微涂厚), 晾干后用甲醇:冰乙酸 (3:1) 固定 5 min 再晾干, 然后用 0.025% 胰蛋白酶 (1/15 mol/L PBS, pH7.0, 37 °C) 消化 5 min, 再固定 5 min 后晾干备用.

1.2.2 融合基因探针 美国 VYSIS 公司提供, bcr 基因探针长度约为 300 kb, 覆盖 22 号染色体长臂远侧端 (3' 端) 自 13 外显子至近着丝粒端 (5' 端) 包括 m-bcr 的区域, 用异硫氰荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 直接标记, abl 基因探针长度约为 200 kb, 覆盖 9 号染色体长臂远侧端 abl 基因第 5 外显子至近着丝粒端的区域, 用罗达明 (rhodamine) 直接标记^[1].

1.2.3 FISH 操作步骤 将玻片标本浸入 73 °C 70% 甲酰胺溶液中变性 5 min, 取出立即置入预冷在 -20 °C 的 70% 乙醇中固定 2 min, 再经乙醇系列脱水, 空气干燥备用. 取 abl 基因探针和 bcr 基因探针混合物 (美国 VYSIS 公司) 1 μL 与杂交缓冲液 9 μL 混合, 置 73 °C 水浴中变性 5 min, 然后滴至预温在 45 °C 的待杂交玻片上, 盖上盖玻片, 用橡胶水封片, 置于 37 °C 密闭湿盒内杂交 16~20 h, 揭下盖玻片, 依次浸入 45 °C 50% 甲酰胺漂洗 2 次, 每次 10 min, 再分别经 45 °C 2 × SSC/Np-40 漂洗 10 min, 45 °C 2 × SSC/0.1% Np-40 漂洗 10 min, 避光空气干燥 30~60 min, 用 0.01% 二氨基酚吡啶 (DAPI) 复染, 盖上盖玻片, 用橡胶水封片. 用 Olympus BX60 荧光显微镜检查杂交结果, 用 Olympus PM30 显微照相机多重曝光分别记录两种探针在同一个间期细胞或中期分裂相中所发出的荧光信号 (见图 1).

1.3 统计学方法

t 检验比较标准 Ph 染色体的 CML 与 Ph 染色体阴性及变异 Ph 染色体的慢性髓细胞性白血病急变时间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

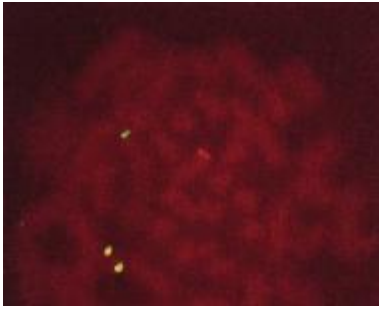


图1 双色荧光原位杂交信号: abl 基因(红点)表达于第9号染色体上, bcr 基因(绿点)表达于第22号染色体上, bcr/abl 融合基因(黄点)表达于 Ph 染色体上

Fig. 1 FISH signals of the above metaphase:abl gen(red signals) on chromosomes 9;bcr gene(green signals) on chromosomes 22;bcr/abl fusion gene(yellow signals) on ph1 chromosomes

2 结果

264 例 CML 患者的骨髓染色体检测, 检测出 Ph 染色体阴性[t(9;22), Ph chromosome negative) 14

例, 阴性率 5.3%, 其余为 Ph 染色体阳性, 阳性率为 94.7%。在观察到 CML 急变的 43 例患者中, 标准 Ph 染色体 (typical Ph chromosome) 22 例, Ph 染色体阴性 (Ph chromosome negative) 9 例, 双 Ph 染色体[46,XX,t(9;22)/47,XX,t(9;22)]2 例, 变异 Ph 染色体[46,XX,t(9;14;22)、46,XY,t(9;11;22)、46,XX,t(1;21),t(17;22)]3 例, 标准 Ph 染色体伴其它染色体易位[46,XY,t(9;19)(9;22)]3 例, Ph 染色体阴性伴其它染色体易位[46,XY,(9;18)]1 例, Ph 染色体阴性伴倒位[46,XY,inv(2)(p21-q13)]2 例, Ph 染色体阳性伴倒位 (Ph chromosome with inversion) 1 例。43 例患者 bcr/abl 融合基因表达 (+)。43 例患者中 24 例急变时发生了染色体核型及融合基因改变, 19 例患者染色体核型及融合基因没有发生变化。t 检验比较标准 Ph 染色体的 CML 患者与 Ph 染色体阴性和变异 Ph 染色体及其它变异的 CML 患者急变时间(月), 差异有统计学意义(见表 1)。

表 1 CML 患者急变时间比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of blast crisis time among typical ph chromosome and variant ph chromosome and Ph - chromosome in CML patients ($\bar{x} \pm s$)

CML 类型	n	急变时间 (月)
标准 Ph 染色体的 CML	22	44.190 5 ± 7.828 4
变异 Ph 染色体及 Ph - 的 CML	21	11.095 2 ± 2.014 1*

与标准 Ph 染色体的 CML 比较, *P<0.05.

3 讨论

白血病是一组高度异质性的恶性血液疾病, 与正常造血细胞不同, 白血病细胞失去了进一步分化成熟的能力或增殖与分化能力不平衡, 而阻滞在不同的阶段。以此为依据, 可以对白血病进行分类, 原阻于不同阶段的造血干/祖细胞具有与其对应的形态学、细胞化学、免疫学表型特征, 因而具有多样的生物学特性, 近年来, 随着细胞遗传学、分子生物学研究技术的进步, 对肿瘤细胞的研究有了更深层次的认识。许多白血病有特异性的染色体改变, 而且一些亚型也表现特异性的染色体改变, 随着疾病的进程, 白血病恶性克隆的演化在细胞遗传学上表现为染色体核型变异和基因表达的改变。CML 病程分慢性期、加速期、急变期, 加速期、急变期是患者生存的分水岭; CML 一旦急变, 其疗效极差, 缓解率和生存时间明显低于同类型初发急性白血病。就此原因有多种生物学因素, 用于急性白血病复发、难治相似

的理论推导, CML 急变 (blast crisis, CML-BC) 的细胞遗传学、基因改变可能是重要的因素。CML 细胞核型的多样性和复杂性与预后显著的关系。那么, CML 病程中急变 (CML-BC) 和干细胞移植后其细胞遗传学和分子生物学特性是否会改变, 是否存在克隆演化现象, 其克隆演化与疗效的关系值得深入研究。

一些研究结果提示变异的 Ph 染色体易位易发生核型演化和急变, 尤其是新的染色体畸变时 CML 可能就将进入急变期, 我们的前期研究也得到了相同的结论^[2-4]。本研究观察的 43 例 CML 中[t(9;22)(q11;34)]标准染色体 22 例, Ph 染色体阴性和其它变异的 Ph 染色体 21 例; 两组病例急变时间比较, 后者急变时间明显短于前者, 得到类似的研究结果。Ph 染色体阴性和其它变异的 Ph 染色体 CML 患者的预后较差, 往往在 2 a 左右发生加速或/和急变, 急变后的治疗效果也是不良的, 说明 CML 细胞核型的多样性和复杂性与预后显著的关系。43 例患者中 24 例急变时发生了染色体核型及融合基因改变, 说明随着疾病的进展其恶性克

隆发生了改变,即肿瘤克隆在疾病发展过程中已发生了演化.这种生物学上的演化给临床上带来的困难是难治.

9/43 例变异的 Ph 染色体的 CML 均检测出 bcr/abl 融合基因,说明此类 CML 仍然由 bcr/abl 融合基因发动.这与国外学者的研究结果一致^[3],1 例 Ph 染色体阴性伴其它染色体易位,检测出 bcr/abl 融合基因,2 例 Ph 染色体阴性伴倒位未检测出 bcr/abl 融合基因.可能存在其它融合基因形成的发病机制,国外有个别报告,此类 CML 病例的发病机理值得进一步研究. CML 的细胞遗传学不仅为诊断提供可靠、可循的依据,亦对预后判断有重要意义^[5,6].

[参考文献]

[1] ABE S, MINAMIHISAMATSU M, ISHIHARA T, et al. C-hromosomal in situ hybridization and Southern blot analyses

using c-abl, c-sis, or bcr probe in chronic myelogenous leukemia cells with variant Philadelphia translocations [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 1989, 38(1): 61 - 74.

- [2] 李正发, 沈晓梅, 赵仁彬, 等. 急性髓细胞性白血病微分化型 (ANLL—M0) 的临床研究 [J]. *昆明医学院学报*, 2003, 24(1): 39 - 41.
- [3] 李正发, 沈晓梅, 宋建新, 等. Wortmannin 抑制 PI3K 途径对 K562 细胞增殖和 Ara-C 诱导的细胞凋亡的影响 [J]. *昆明医学院学报*, 2004, 25(4): 17 - 19.
- [4] 李正发, 沈晓梅, 朱宝生, 等. 慢性髓细胞性白血病的细胞遗传学与预后的临床分析 [J]. *中国肿瘤临床*, 2002, 29(9): 665 - 667.
- [5] 钱思轩, 李建勇, 潘金兰, 等. 荧光原位杂交技术在异性间造血干细胞移植后 Ph 阳性白血病的检测意义 [J]. *中华内科杂志*, 2006, 45(3): 253 - 255.
- [6] 李正发, 沈晓梅, 朱宝生, 等. 白血病患者异基因造血干细胞移植后细胞遗传学标志的临床观察 [J]. *中国医师杂志*, 2007, 9(10): 1 300 - 1 303.

(2011 - 12 - 09 收稿)

(上接第 11 页)

rotein family involved in inflammation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4 (2): 95 - 104.

- [9] ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H, et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD [J]. *Nature*, 1998, 391: 43.
- [10] 郎海滨. Bcl-2 家族蛋白与线粒体凋亡路径研究进展 [J]. *国外医学卫生分册*, 2004, 31(2): 88 - 91.
- [11] SENMANN S, STOLL G, SCHROETER M, et al. Differential regulation of Bax, Bcl-2, and Bel-X proteins in focal cortical isehemia in the rat [J]. *Brain pathol*, 1998, 8

(1): 49 - 62.

- [12] 江基尧, 徐蔚, 毛青, 等. 脑超深低温下猴脑血流阻断时间窗的研究 [J]. *中华神经外科杂志*, 2008, 10, 24 (10): 756 - 758.
- [13] ALGRA S O, KORNMANN V N, VAN DER TWEEL, et al. Increasing duration of circulatory arrest, but not ante-grade cerebral perfusion, prolongs postoperative recovery after neonatal cardiac surgery [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2011, 7: 189 - 192.

(2011 - 10 - 18 收稿)