

急性髓系白血病患者外周血 *WT1* mRNA 表达水平的检测

聂常富¹, 王建国¹, 郭志华¹, 荆晓岳¹, 何蕴韶²

(1. 新乡医学院一附院基因中心, 河南 卫辉 453100; 2. 中山大学达安基因诊断中心, 广东 广州 510089)

摘要: 目的 建立 real time RT-PCR 检测 *WT1* 基因表达的方法, 了解急性髓系白血病 (AML) 患者外周血 *WT1* 基因的表达水平。方法 建立 real time RT-PCR 方法, 用 PE ABI 7700 PCR 仪检测 66 例 AML 患者、26 例非白血病患者和 36 例正常人外周血中 *WT1* 基因的 mRNA 表达水平。结果 22 例 AML 初发患者 *WT1* 基因的表达量为 ($10^5 \sim 10^6$) 拷贝/ μgRNA , 取得部分缓解的 26 例 AML 患者的表达水平为 ($10^2 \sim 10^4$) 拷贝/ μgRNA , 而取得完全缓解的 17 例 AML 患者的表达水平为 ($0 \sim 10^2$) 拷贝/ μgRNA 。结论 *WT1* 基因在 AML 外周血中有高的表达水平, 可作为疗效考核及监测微残留病的指标。

关键词: 急性髓系白血病; Wilm's 瘤基因; 实时; 逆转录聚合酶链反应

中图分类号: R557 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2004)06-0353-03

Detection of *WT1* gene expression in peripheral blood of patients with acute myeloid leukemia

NIE Chang-fu¹, WANG Jian-guo¹, GUO Zhi-hua¹, JING Xiao-yue¹, HE Yun-shao²

(1. The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Weihui 453100, China; 2. Daan Gene Diagnosis Center of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: **Objective** To establish a real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method for detecting level of the expression of the Wilm's tumor (*WT1*) gene in peripheral blood of patients with acute myeloid leukemia (AML). **Method**

The mRNA expression of the *WT1* gene was detected with PE ABI 7700 PCR apparatus in peripheral blood specimens collected from 66 AML patients, 26 non-leukemia patients and 36 normal humans. **Result** Level of the expression of *WT1* gene was ($10^5 \sim 10^6$) copies/ $\mu\text{g RNA}$ in 22 newly diagnosed patients with AML, ($10^2 \sim 10^4$) copies/ $\mu\text{g RNA}$ in 26 partially remittal patients and ($0 \sim 10^2$) copies/ $\mu\text{g RNA}$ in 17 completely remittal ones, respectively. **Conclusion** Level of expression of the *WT1* gene in patients with AML was significantly higher than that in nonleukemia patients and normal humans, which can be used as an indicator for therapy efficacy and undetectable or trace residual of AML.

Key words: Acute myeloid leukemia (AML); Wilm's tumor (*WT1*) gene; Real-time; Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

WT1 基因 (Wilm's tumor gene) 位于人类染色体 11P13, 与 Wilm's 瘤的发生密切相关^[1], 近年来发现 *WT1* 在白血病细胞中高度表达^[2], 可能参与白血病的发生发展, 并与其预后有关, 可作为检测微残留病 (minimal residual disease, MRD) 的指标。如何准确测定白血病患者 *WT1* 基因的表达水平以指导临床, 是许多学者关注的问题。为此我们采用 real time RT-PCR 技术检测了急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 患者外周血 *WT1* 基因的表达水平, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料

研究组 66 例 AML 患者为中山大学附属一院 1999 年 11 月至 2003 年 3 月住院患者, 男 33 例, 女 33 例,

年龄 9~76 岁。所有患者均经临床、血象、骨髓象及组织化学染色检查, 符合 1981 年 FAB 协作组提出的分类诊断标准^[3], 其中初发患者 22 例、部分缓解患者 26 例、完全缓解患者 17 例、治疗无效者 1 例。

对照组 62 例中, 男 40 例, 女 22 例, 年龄 8~70 岁。非白血病患者 26 例, 其中非何杰金氏淋巴瘤 (non-Hodgkin's disease, NHL) 患者 11 例、何杰金氏病 (Hodgkin's disease, HD) 患者 4 例、多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 患者 11 例, 以上患者均经临床及病理学检查证实; 36 例健康人来自广州市中心血站及健康志愿者。慢粒急变系 K562 细胞株来自中山医科大学肿瘤研究所。

1.2 RNA 的提取及 cDNA 合成

2 ml EDTA 抗凝血, 提取外周血总 RNA, 测 260~280 nm 吸光值, 计算出 RNA 的含量, 使用 Promega 逆转录试剂盒, 按说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,

收稿日期: 2004-05-11; 修回日期: 2004-06-23

作者简介: 聂常富 (1970-), 男, 河南省获嘉县人, 主治医师, 硕士学位, 主要从事肿瘤的基因诊断研究。

-20℃冻存备用。

1.3 引物及探针的设计、合成

WT1 上游引物序列 5'-CCA CAG CAC AGG GTA CGA GAG-3'；下游引物序列 5'-TCT CAG ATG CCG ACC GAT CAA-3'；扩增片段长度 152 bp。探针序列 5'-ACC ACA CAA CGC CCA TCC TCT G-3'，其中 5'端标记荧光发光基团 FAM (6-carboxy-fluorescein)，3'端标记荧光淬灭基团 TAMRA (6-carbox-tetramethylrhodamine)，并对于 3'端羟基进行封闭。

1.4 定量阳性模板的克隆

培养 K562 细胞，提取 RNA 并逆转录，扩增出特异的 152 bp 片段，纯化、测序后克隆至 pMD18-T 载体 (大连宝生物公司)，抽提、纯化重组质粒，测 OD 值，根据分子量换算为拷贝数，按 10^{10} 拷贝/ μ l 浓度冻存于 -20℃ 备用。

1.5 Real time RT-PCR 原理

在普通 PCR 扩增体系中，加入一条与靶基团序列互补的双荧光标记探针 (5'端为荧光报告基团，3'端为荧光淬灭基团)，在完整状态下探针 5'报告基团发出的荧光可被 3'淬灭基团吸收或抑制。PCR 扩增时，当引物沿模板延伸至标记探针结合部时，探针 5'端报告基团可被 Tag 酶的 5'-3'外切酶活性作用切下，脱离 3'淬灭基团的抑制作用而发出荧光，切下的荧光素的数量与扩增产物是一对一的关系，用检测仪连续检测荧光值的变化，即可准确判断扩增产物的量，在判定结果时，用循环阈值 (cycle threshold, CT) 作为临界点，该点位于 PCR 产物消除荧光背景后进入指数增长期的始点，与 PCR 体系中起始模板量的对数值之间有着严格的线性关系。利用阳性梯度标准品的 CT 值制成标准曲线，再根据样品的 CT 值，就可以准确定出起始模板的拷贝数^[4-5]。

操作方法：50 μ l PCR 反应体系中，5 $\times$ PCR 缓冲液 10 μ l，*WT1* 上下游引物各 16 pmol/L，荧光探针 10 pmol/L，Tag 酶 3 U，10 mmol/L dNTP 1 μ l，cDNA 5 μ l，同时将克隆的定量模板按 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 梯度稀释，加于不同反应管中，在 ABI PRISM7700 型荧光 PCR 仪 (美国 PE 公司) 进行扩增；反应条件：93℃ 预变性 2 min，93℃、45 s 至 55℃ 120 s，共 40 个循环，反应结束后由计算机自动计算定量结果。

1.6 统计学处理

计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述，两组样本间均数比较用独立样本的 *t* 检验，两组以上均数

比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 AML 患者 *WT1* 基因的 mRNA 表达水平

66 例 AML 患者 *WT1* 基因的 mRNA 表达水平见表 1。*WT1* 基因表达水平在初发组高于部分缓解组，而完全缓解组表达水平最低，有 5 例 *WT1* 基因 mRNA 表达为阴性，3 组间的表达水平差异具有显著性 (方差分析， $P < 0.05$)。

表 1 66 例急性髓系白血病患者 *WT1* 基因的 mRNA

表达水平		copies/ μ g RNA			
分组	病例数	WT1 基因表达水平			
		最高值	最低值	平均值	
初发组	22	6.8 $\times 10^6$	1.1 $\times 10^5$	1 588 727 $\pm$ 1 556 499	
部分缓解组	26	2.6 $\times 10^4$	4.8 $\times 10^2$	7 190 $\pm$ 7 110	
完全缓解组	17	4.4 $\times 10^2$	0 (5 例)	146 $\pm$ 144	
未缓解组	1	1.08 $\times 10^5$			

注：1 例未缓解患者未纳入数据统计范围。

2.2 对照组 *WT1* 基因的表达水平

对照组的 62 例标本中 (表 2)，*WT1* 基因最高表达量为 6.4×10^2 ，有 26 例 *WT1* 基因表达为阴性 (MM 患者 3 例，NHL 患者 3 例，HD 患者 1 例，正常人 19 例)，平均表达水平为 (105 $\pm$ 156) copies/ μ g RNA，其中 NHL、HD、MM 和正常人 4 类人之间 *WT1* 的表达水平差异无显著性 (方差分析， $P > 0.5$)。

表 2 对照组中 *WT1* 基因的表达水平

对照组 分类	例数	WT1 基因表达水平		
		最高值	最低值	平均值
MM	11	5.8×10 ²	0 (3 例)	157±181
NHL	11	3.4×10 ²	0 (3 例)	104±111
HD	4	5.0×10 ²	0 (1 例)	149±236
正常人	36	6.4×10 ²	0 (19 例)	85±152

AML 初发和部分缓解患者 *WT1* 基因 mRNA 表达水平明显高于对照组的表达水平，经统计分析差异有显著性 (*t* 检验， $P < 0.05$)，而取得完全缓解的 AML 患者其 *WT1* 表达水平和对照组相比差异无显著性 (*t* 检验， $P > 0.3$)。

3 讨论

白血病的发生可能与射线、病毒、遗传因素及化学因素如苯、烷化剂等有关。白血病患者取得完全缓解后是否有微残留病的存在与预后密切相关，动态监测 MRD 可以早期预报复发，据此能及时采取有效的治疗措施以防止复发，因而 MRD 的监测是白血病治疗过程中的一个重要环节。

通过 real time RT-PCR 方法检测，我们发现 AML

患者外周血中 *WTI* 基因 mRNA 的表达具有一定的规律性, 初发患者表达水平在 $10^5 \sim 10^6$ 数量级, 经化疗后取得部分缓解的患者其表达水平在 $10^2 \sim 10^4$ 数量级, 而取得完全缓解的患者其表达水平仅为 $0 \sim 10^2$ 数量级, 三者之间依次相差 1~2 个数量级, 表明 *WTI* 基因在 AML 患者外周血中的 mRNA 表达水平是随其白血病细胞数的减少而降低的。在 AML 治疗过程的不同时期, *WTI* 基因的表达水平存在明显差异, 因而 *WTI* 基因可作为白血病疗效考核和 MRD 检测的一个比较敏感的指标^[6~8]。

在其他血液病如多发性骨髓瘤、何杰金氏病、非何杰金氏病淋巴瘤患者外周血中, *WTI* 基因处于较低的表达水平或检测不到, 与正常人的表达水平无显著差别。在 AML 初发患者, 其 *WTI* 基因平均表达水平是对照组的 15 000 倍, 表明该基因在白血病细胞中的表达具有较高的特异性, 可作为 AML 的标志基因, 用于临床鉴别诊断或疾病筛查。

Real time RT-PCR 是最近发展起来的一项新技术, 它结合探针杂交的高特异性, PCR 技术的高效核酸扩增和光化学技术的敏感及易定量等优点, 从扩增到结果分析均在 PCR 反应管封闭状态下进行, 解决了 PCR 产物污染而导致假阳性的问题, 其结果用拷贝数来表示, 这种绝对数量更为准确, 易于统一标准, 便

于不同的实验室之间进行比较。本实验采用 real time RT-PCR 方法对 *WTI* 基因的表达进行了初步研究, 表明该技术具有较好的灵敏性和特异性, 可作为 *WTI* 基因检测的首选方法。

参考文献:

- [1] Call KM, Glaser T, Ito CY, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus [J]. Cell, 1990, 60 (3): 508-520.
- [2] Miwa H, Beran M, Saunders GF. Expression of the Wilms' tumor gene (*WTI*) in human leukemias [J]. Leukemia, 1992, 6 (5): 405-409.
- [3] 陆道培. 白血病治疗学 [M]. 北京: 科学出版社, 1992. 1-20.
- [4] Kreuzer KA, Saborowski A, Lupberger J, et al. Fluorescent 5'-exonuclease assay for the absolute quantification of Wilms' tumour gene (*WTI*) mRNA: implications for monitoring human leukaemias [J]. Br J Haematol, 2001, 114 (2): 313-318.
- [5] Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR [J]. Genome Res, 1996, 6 (10): 995-1001.
- [6] Patmasiriwat P, Fraizer G, Kantarjian H, et al. *WTI* and GATA1 expression in myelodysplastic syndrome and acute leukemia [J]. Leukemia, 1999, 13 (6): 891-900.
- [7] Inoue K, Ogawa H, Yamagami T, et al. Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring *WTI* (Wilms tumor gene) expression levels [J]. Blood, 1996, 88 (6): 2267-2278.
- [8] Gang M, Moore H, Tobal K, et al. Prognostic significance of quantitative analysis of *WTI* gene transcripts by competitive reverse transcription polymerase chain reaction in acute leukaemia [J]. Br J Haematol, 2003, 123 (1): 49-59.

电镀工人职业性接触性皮炎 1 例报告

Occupational contact dermatitis in an electroplater

刘广仁, 李林峰

(北京大学第三医院皮肤科, 北京 100083)

电镀工人经常接触金属、电镀液及橡胶手套等, 金属镍、电镀液中的香料及橡胶添加剂是常见的接触过敏原。本科收治的 1 例患者, 经斑贴试验证实为镍、香料及橡胶添加剂过敏, 现报告如下。

1 病例介绍

患者, 男, 37 岁, 电镀工, 从业 3 年。2 年前, 患者面部、胸背部开始起皮疹, 伴眼睑肿胀。离开工作环境 20 d 后可自行消退。再次到工作环境中又复发, 如此反复 3 次。来我科就诊, 查体: 生命体征正常, 心肺肝脾无异常。皮肤科检查: 双眼睑肿胀, 双面颊、胸前、背部见片状红斑, 针头大红色丘疹, 压之褪色, 双手掌粗糙、角化、肥厚, 指侧缘见米粒大丘疹。患者从事电镀工作, 在工作中亦接触橡皮手套、胶合板等。同事 10 余人中 3 人亦有类似情况。

2 斑贴试验

采用瑞典生产标准抗原系列 (瑞典化学诊断 AB 公司) 在

患者皮损消退后进行常规斑贴试验, 按 ICDRG 标准判定^[1]。结果秋兰姆混合物、硫酸镍及芳香混合物均呈阳性反应。

根据患者职业史、皮损特点及斑贴试验诊断职业性接触性皮炎明确。

3 讨论

患者对秋兰姆混合物、硫酸镍及芳香混合物三种致敏原呈阳性反应。致敏原镍主要存在于合金中, 镍具有防腐性能, 作为金属的保护层, 被广泛用来电镀。该患者就是一名电镀工。秋兰姆混合物含有四乙基秋兰姆二硫化物、四甲基秋兰姆二硫化物、四甲基秋兰姆一硫化物及二戊基秋兰姆二硫化物共 4 种物质, 均是橡胶硬化过程中的加速剂, 广泛用于橡胶工业。手套是最常见的引起橡胶反应的原因, 该患者在工作中经常戴橡皮手套。除以上两种外, 患者还对芳香混合物呈阳性反应, 该致敏原主要存在于香料、化妆品、香水及日常芳香产品如香皂、牙膏、口香糖、冰淇淋等物品中, 该患者工作环境中电镀液亦含有芳香混合物。因此, 该患者皮炎的发生与电镀液也有关。

参考文献:

- [1] Wahlberg JE. Diagnostic patch tests [A]. In: Rycroft RJG, Memré T, Frosch PJ, et al. Textbook of contact dermatitis [M]. Berlin: Springer-verlag, 1992. 241-336.