文章编号:1000-5404(2014)03-0267-03

论著

实时定量PCR检测慢性粒细胞白血病患者Shh、Smo基因的表达水平

朱华民[1,3],李扬秋[2] (510632 广州,暨南大学:医学院血液病研究所[1],再生医学教育部重点实验室[2];524001 广东 湛江,广东医学院附属医院急救中心[3])

[摘要] **目的** 建立Hedgehog信号通路功能性基因Shh和功能性受体蛋白Smo基因的定量检测方法,并分析其在慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia,CML)患者中的表达水平。**方法** 利用实时定量PCR检测20例CML患者和作为正常对照(8例)的健康人外周血细胞中Shh、Smo基因的表达水平,以β2微球蛋白(β2-M)基因作为内对照。**结果** CML组Shh、Smo表达水平均明显高于正常对照组($P<0.05$)。**结论** 成功建立Shh、Smo基因的定量检测方法;Shh、Smo基因在CML中高表达。

[关键词] Shh、Smo基因;慢性粒细胞白血病;实时定量PCR;基因表达
[中图法分类号] R394-33; R394.3; R733.72 [文献标志码] A

Quantitative detection of Shh and Smo gene expression in chronic myeloid leukemia by real-time PCR

Zhu Huamin[1,3], Li Yangqiu[2] ([1]Institute of Hematology, College of Medicine, [2]Key Laboratory for Regenerative Medicine of Ministry of Education, Jinan University, Guangzhou, Guangdong Province, 510632; [3]Center of Emergency, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong Province, 524001, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish Hedgehog signaling pathway detection method for Shh gene and Smo gene using real-time PCR quantitatively, and analyze their expression levels in chronic myeloid leukemia (CML) patients. **Methods** Using Real-time PCR with SYBR Green Ⅰ technique, Shh gene and Smo gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells from 8 normal individuals (control) and 20 CML patients was detected with β2-microglobulin (β2M) as reference to acquire the relative expression levels. **Results** Shh and Smo expression levels in CML patients were significantly higher than those in the normal control ($P<0.05$). **Conclusion** The quantitative detection method for Shh and Smo gene expression by real-time PCR with SYBR Green Ⅰ technique has been successfully established. Shh gene and Smo gene are highly expressed in CML patients.

[**Key words**] Shh gene; Smo gene; Chronic myeloid leukemia patients; real-time RT-PCR; gene expression

Supported by the Key Project of Natural Science Foundation of Guangdong Province (9251063201000001). Corresponding author: Li Yangqiu, E-mail: jnyangqiuli@163.com

Hedgehog信号通路是人类胚胎发育过程中调控细胞增殖和组织分化的重要信号通路。文献[1]报道该信号通路在人类多种肿瘤中异常激活,并对这些肿瘤的生长起着促进作用。Hh蛋白是一个关键成形素(mophorgen)和分泌性的信号蛋白,通过自我剪接过程,可以将一个45 000的前体转变为19 000功能性蛋白。在脊椎动物中,编码Hh蛋白的Hh基因至少有3个同源基因:Sonic Hodgehog(Shh)、Indian Hodgehog(Ihh)和Desert Hodgehog(Dhh)。其中最重要也是研究最深的是Shh,它被认为可能与脑、脊髓中轴骨骼及淋巴发育有关。对于人类来说,Shh定位在7号染色体长臂远端,含3个外显子,cDNA长度1 576 bp,编码462个氨基酸的多肽,此分泌性多肽经剪切掉信号肽后,在胆固醇介导下自身催化裂解为C末端结构域(Shh-C)和N末端结构域(Shh-N)[2]。

Smo基因(Smoothened)是该信号通路中的关键基因,控制着Hedgehog信号向细胞膜内的传递。Smo是Hedgehog信号传递所必需的受体,在无Hedgehog信号的情况下,激活Smo可导致Hedgehog靶基因的活化;基因Smo突变时,可出现与Hedgehog基因突变相同的表征[3]。慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia,CML)是来源于造血干细胞的克隆性恶性增生性疾病。有报道Hedgehog信号通路的异常活化与血液肿瘤的发生相关并与造血干细胞损伤有关[4]。

[基金项目] 广东省自然科学基金重点项目(9251063201000001)
[通信作者] 李扬秋,E-mail: jnyangqiuli@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131107.1612.002.html(2013-11-07)

本研究利用实时定量 PCR 分析 Shh、Smo 在慢性粒细胞白血病患者中的表达水平，旨在为以后以 Shh、Smo 基因为靶基因治疗 CML 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 样本

经细胞形态学、细胞化学和细胞免疫学确诊的 CML 患者 20 例（初诊），8 例健康人外周血样本作为正常对照组（来源于广州华侨医院）。收集肝素抗凝外周血标本，采用 Ficoll 梯度分离法分离外周血单个核细胞。

1.2 主要试剂及引物

实时定量 PCR 试剂盒购自 Bio-Rad 公司，实时定量 PCR 反应管和反应仪器为美国 Bio-Rad 公司产品，RNA 提取应用 TRIzol 试剂盒及反转录酶试剂盒（Superscript Ⅱ）购自美国 Gibco 公司，引物由 Invitrogen 公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 RNA 提取和 cDNA 合成 RNA 提取应用 TRIzol 试剂盒，并用分光光度计测 RNA 纯度和浓度，用电泳检测 RNA 的完整性。应用随机引物和反转录酶试剂盒反转录合成 cDNA 第 1 链，按常规方法进行。并经 β2 微球蛋白（β2M）基因的实时定量 PCR 确定所合成 cDNA 的质量。

1.3.2 扩增效率一致性检测 利用相对定量法检测 CML 患者与正常人 Shh、Smo 表达情况之前，首先必须保证 Shh、Smo 和看家基因 β2M 的扩增效率一致。故将 cDNA 10 倍倍比稀释，以 1、10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4} cDNA 作为模板，进行 SYBR-Green Ⅰ实时定量 PCR 来检测其扩增效率是否一致[5]。

1.3.3 SYBR Green Ⅰ实时定量 PCR 按文献[6]合成 Shh、Smo 和 β2M 的引物。Shh 扩增的目的片段长度为 91 bp，Smo 扩增的目的片段长度为 101 bp，β2M 扩增的目的片段长度为 145 bp。参考本实验室以前的工作方法[7]，利用 SYBR Green Ⅰ染料检测 CML 患者与正常人 Shh、Smo 表达情况，并将 β2M 作为内参照。每一标本分别进行 Shh、Smo 和 β2M 检测。总反应体积为 20 μL，应用 Real MasterMix 试剂盒，包括 2.5 倍 Real MasterMix 9、0.5 μL 上、下游引物以及 1 μL cDNA。反应条件：95 ℃ 15 min 变性后，共进行 40 个循环扩增，每一循环包括 95 ℃ 15 s、60 ℃ 30 s 和 80 ℃ 5 s，并在 80 ℃读板 1 次。随后，以 0.17 ℃/s 变化速度，从 65～95 ℃每隔 2 s 记录 1 次荧光值，获得融解曲线。反应分别设空白组、阴性对照组、阳性对照组及样品组。将所扩增的 PCR 产物融解曲线进行分析，同时随机进行体积分数为 2% 琼脂糖凝胶电泳，以确定产物是否为所扩增的目的片段。反应在 C1000™ 荧光定量 PCR 仪中进行。样本均重复检测 2 次。Shh 上游引物：5′-CGGCTTCGACTGGGT-GTACT -3′，下游引物：5′-GCAGCCTCCCGATTTGG -3′；Smo 上游引物：5′-CAGCTTCCGGGACTATGTGCTATG-3′，下游引物：5′-GAAGGCTCGGGCGATTCTTG-3′；β2M 上游引物：5′-TACACT-GAATTCACCCCCAC-3′，下游引物：5′-CATCCAATCCAAATGCG-GCA-3′。

1.3.4 Shh、Smo 的相对定量分析 按文献[8]采用相对定量法分析 CML 和正常人的外周血单个核细胞 Shh、Smo 表达水平的比较。以 β2M 为内参照，利用 Ct 值即每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数，计算 CML 和正常人 Shh、Smo 基因 mRNA 的相对表达量。相对定量公式：$2^{-\Delta Ct} \times 100\%$，其中，$\Delta Ct = Ct_{待测基因} - Ct_{\beta 2M}$。

1.4 统计学分析

利用 SPSS 17.0 统计分析软件，不同样本中 Shh、Smo 基因 mRNA 水平的比较行独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 扩增效率一致性分析结果

以 cDNA 的 log 值作为横坐标，$\Delta Ct(Ct_{待测基因} - Ct_{\beta 2M})$ 作为纵坐标，得出直线的斜率为 0.060，接近于 0，说明待测基因和 β2M 的扩增效率一致，可以利用公式 $2^{-\Delta Ct} \times 100\%$ 进行本实验的结果分析。

2.2 实时定量 PCR 及琼脂糖凝胶电泳检测结果

无论是 CML 患者还是正常人，β2M 产物的融解曲线峰值均在 88 ℃，Shh 产物的融解曲线峰值在 83 ℃，Smo 产物的融解曲线峰值在 82 ℃（图 1、2）。并取随机样品的 Shh、Smo 和 β2M 产物，经体积分数为 2% 琼脂糖凝胶电泳分析，参照 100 bp DNA 标准显示 PCR 产物片段大小正确，分别为 91、101 bp 和 145 bp。见图 3。

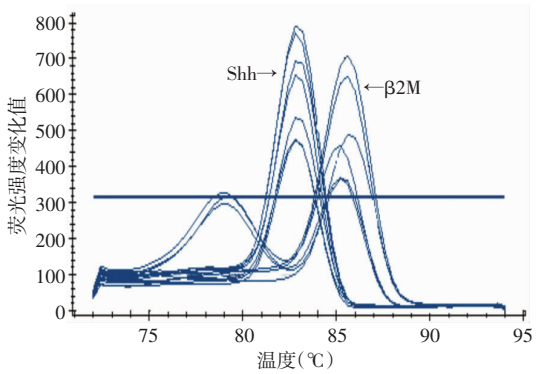


图 1 部分 CML 患者和正常人 Shh 和 β2M 融解曲线

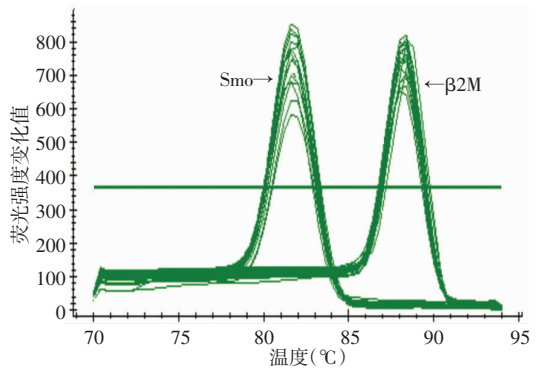
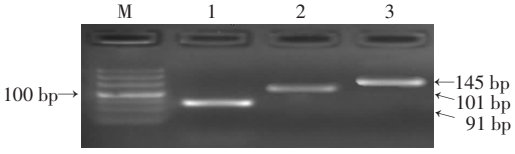


图 2 部分 CML 患者和正常人 Smo 和 β2M 融解曲线



M：标准；1：Shh；2：Smo；3：β2M

图 3 PCR 产物电泳结果

2.3 Shh、Smo 在 CML 中的表达情况

CML 组 Shh[(37.4±4.3)%]、Smo[(38.6±4.0)%]表达水平均明显高于正常对照[分别为(1.3±0.2)%、(1.1±

0.2)%, $P<0.05$]。

3 讨论

在人类 Hedgehog 信号通路主要是分支 Sonic hedgehog(Shh)。Sonic hedgehog 信号通路主要由分泌型信号糖蛋白 Shh 配体、跨膜蛋白受体 Ptc 和另一跨膜蛋白 Smo 组成的复合物,以及下游转录因子 Gli、蛋白(Gli1、Gli2、Gli3)组成[9]。皮肤、神经、肠道等多系统不同胚层发生来源等肿瘤的发生与 Sonic hedgehog 信号通路的异常激活有关[10-12],同时 Hedgehog 信号通路的异常活化还可能与血液肿瘤的发生和造血干细胞损伤有关。

Shh 信号由于调节组织的形态演变和干细胞的生成,所以它的表达异常与许多肿瘤生成有关。还有,通过调节下游信号分子,Shh 信号可以扮演着干细胞调节者的角色。Sonic hedgehog、Wnt、Hox 和 Notch 信号通路之间有紧密联系。所以我们猜测 Shh 在造血干细胞发育早期有重要的调节作用,其异常表达与 CML 的发生、发展有相关性。目前有一些研究涉及这一内容,但总体的研究报道不多。有报道在 $CD34^+$ CML 细胞中,Hedgehog 信号通路负调节因子 Ptc1 表达水平明显增高[13]。

本研究结果显示,无论是患者还是正常人,Shh、Smo 基因的融解峰是单峰,Shh 融解温度是 83 ℃,Smo 融解温度是 82 ℃;β2M 的融解峰是单峰,融解温度是 88 ℃;在所检测的样本中未发现融解曲线的改变和基因突变的情况。Smo 基因和 β2M 扩增效率一致。利用实时定量 PCR 分析 CML 患者和作为正常对照的健康人外周血单个核细胞中 Smo 基因的表达水平,以 β2-M 基因作为内参照。CML 组 Smo 表达水平均明显高于正常对照组($P=0.023$)。这表明 Hedgehog 信号通路主要功能基因的表达在 CML 中是上调的,与在其他肿瘤中相类似。

在 Sonic hedgehog 信号通路中 Smo 蛋白起信息转换作用,细胞外的 Shh 信号通过 Smo 蛋白转换成细胞内的 Gli 信号,细胞核内基因的转录才能开启,对 Sonic hedgehog 信号通路具有激活作用。目前推测 Smo 促进 CML 生成的可能机制与细胞质内转录因子 Gli 有关[14]。细胞质内 Gli 的降解需要泛素化,而泛素化需要事先由 PKA、GSK-3β 介导的磷酸化。泛素化之后,Gli1 完全降解,而 Gli2、Gli3 逐渐退化为低分子量的抑制形式 Gli2R、Gli3R,它们移行到核内,抑制转录。在正常细胞,因为缺乏 Shh 信号或信号过低,细胞质内 Gli 被降解,信号难以下传;而在肿瘤细胞,由于 PI3K/AKT 及 MAPK 被激活,抑制了 PKA、GSK-3β 介导的磷酸化,导致 Gli 难以被降解,Hedgehog 信号得以下传,促进核内转录,从而促进肿瘤发生[15]。

目前有关检测 Hedgehog 信号通路的关键基因 Shh、Smo 在 CML 患者中表达的研究尚少见报道。本研究利用实时定量 PCR 成功建立 Shh、Smo 基因的定量检测方法,方法简单、易操作,重复性强,但限于标本采集原因,本研究未检测治疗前后 Shh、Smo 基因的表达变化,标本数目也不够多,有待进一步探讨。

参考文献:

[1] Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A. Modulators of the hedgehog signaling pathway[J]. Bioorg Med Chem. 2010, 18(18): 6613-6624.

[2] Merchant A A, Matsui W. Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway[J]. Clin Cancer Res. 2010, 16(12): 3130-3140.

[3] Lin T L, Matsui W. Hedgehog pathway as a drug target: Smoothened inhibitors in development[J]. Onco Targets Ther, 2012, 5: 47-58.

[4] Zhao C, Chen A, Jamieson C H, *et al*. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia[J]. Nature, 2009, 458(7239): 776-779.

[5] 黄留玉. PCR 最新技术原理、方法及应用[M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2011: 52.

[6] Balbuena J, Pachon G, Lopez-Torrents G, *et al*. ABCG2 is required to control the sonic hedgehog pathway in side population cells with stem-like properties[J]. Cytometry A, 2011, 79(9): 672-683.

[7] 高杨军, 何冬梅, 陈少华, 等. 实时定量 PCR 检测 B 细胞恶性肿瘤中 BCL11A 基因的表达水平[J]. 暨南大学学报: 医学版, 2011, 32(2): 147-150.

[8] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[9] Kasper M, Regl G, Frischauf A M, *et al*. GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signaling[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(4): 437-445.

[10] Rowbotham N J, Hager-Theodorides A L, Cebecauer M, *et al*. Activation of the Hedgehog signaling pathway in T-lineage cells inhibits TCR repertoire selection in the thymus and peripheral T-cell activation [J]. Blood, 2007, 109(9): 3757-3766.

[11] Crompton T, Outram S V, Hager-Theodorides A L. Sonic hedgehog signalling in T-cell development and activation[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(9): 726-735.

[12] Bailey J M, Singh P K, Hollingsworth M A. Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins[J]. J Cell Biochem, 2007, 102(4): 829-839.

[13] Sengupta A, Banerjee D, Chandra S, *et al*. Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression[J]. Leukemia, 2007, 21(5): 949-955.

[14] Dierks C, Beigi R, Guo G R, *et al*. Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. Cancer Cell[J]. 2008, 14(3): 238-249.

[15] Ok C Y, Singh R R, Vega F. Aberrant activation of the hedgehog signaling pathway in malignant hematological neoplasms[J]. Am J Pathol, 2012, 180(1): 2-11.

(**收稿**:2013-09-03;**修回**:2013-10-06)

(编辑 邓强庭)