维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷 第2期 重庆医科大学学报 Vol.19 No.2
1994 ACTA UNIVERSITATS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1994

87~89,86

B型非何杰金淋巴瘤中bc1-2基因的重排

检验系 冯文莉 R733.4

提 要 本文用两种18染色体上特异性DNA片段的探针和14号染色体上免疫球旦白重链结合区探针，用Southern blot法对25例B型非何杰金淋巴瘤病例(B—NHL)进行bc1-2基因重排的检测，并作了免疫表型和染色体核型检查。发现56%(10/18例)的滤泡型NHL和1/7例弥漫型NHL病人出现了bc1-2基因重排。91%(10/11例)重排病例的bc1-2基因片段与重排的Ig重链结合区的片段一起移动。证实了t(14;18)染色体易位。结果表明，bc1-2基因重排与滤泡型NHL的发病有密切关系。

关键词 非何杰金淋巴瘤; bc1-2基因; 重排 基因重排
中图分类号 R733

由染色体易位使细胞肿瘤基因的激和与几种癌症的病因非常密切。报道最多的易位之一是t(14;18)(q32;q21)，它被普遍认为是一种与滤泡型NHL发病有关的细胞遗传学异常[1]。分子遗传学研究发现，该易位包括在18号染色体上的bc1-2 (B-cell leukemia-lymphoma-2)基因和14号染色体上的免疫球旦白重链基因[2]。由于技术问题，用常规的细胞遗传学方法对t(14;18)易位检查的准确性受到限制，故人类淋巴瘤中含有bc1-2基因重排的广泛程度尚不清楚。采用针对bc1-2和其邻近的染色体片段的特异性DNA探针允许我们对其特点作分子遗传学的分析。该染色体断裂点由Jsujimoto等首先克隆出，[3]，后来对bc1-2的结构、转录物、旦白产物均进行了部分研究[2]。本研究通过对B-NHL病人的18号染色体上DNA重排分析，并比较免疫表型、染色体核型的变化与bc1-2活化的关系，旨在进一步了解bc1-2基因在B-NHL病因学中的作用，为人类淋巴瘤的诊断和分型积累分子遗传学资料。

材料与方法

新鲜组织来源于法国E.Herriot医院25例病人的诊断性淋巴结标本，全部病例均通过血液病理学和细胞病理学检查确诊为淋巴瘤。

用新鲜活检组织制备细胞悬液，免疫荧光法测定全部病例的淋巴细胞表面标记和免疫球旦白重链及轻链(SIg)。单克隆抗体CD_3、HLA—DR;CD_5、CD_{19}、CD_{20};CD_7、CD_{2a};及SIgD.G.M.K.λ抗体分别来自Mason、Coulter、Becton Dickinson和Kallestard公司。抗GAM-FITC来自Coulter公司。用流式细胞仪测定。部分病例作染色体核型检查。

Southern blot分析，从保存于－70℃的冰冻标

维普资讯 http://www.cqvip.com

本或用保存于4℃的70%冷乙醇固定的细胞悬液中提取高分子量DNAs。提取DNAs前，先用PBS洗涤。用不同的限制性内切酶消化，在0.6～0.8%的琼脂凝胶中电泳，然后转移在尼龙膜上。与a-32-p标记的探针，预杂交、杂交等，详见[4]。

DNA探针 PEL-1是1.5kb的HindⅢ-EcoRI-DNA片段，PFL-2是4.3kbEcoRI片段，两者分别在Mbr(MAjor breakpoint region)和mbr(minor breakpoint region)中测定t(14;18)易位的断裂点、由Dr CLEARY提供。Ig重链JH探针可测定整个重链J区，由Dr RABBITTS提供。在18号染色体上，用于研究的靠近或就在Bc1-2基因内的DNA探针示意图如图1.

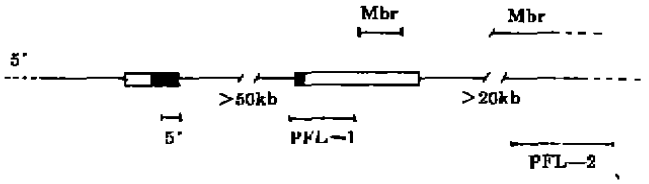


图1 18号染色体上DNA探针的位点与含有和就在Bcl—2原癌基因中的t(14;18)断裂点位置的示意图

实框表示蛋白编码区，虚框为Bcl—2基因转录单位的未翻译部分

结 果

25例淋巴结组织经病理学检查，按照NHL国际工作分类[5]，分为18例滤泡型，其中小裂细胞性9例；混合细胞性4例；大细胞性5例。弥漫型7例，包括淋巴细胞性2例；小裂细胞性1例；混合细胞性1例；大细胞性2例；小无裂细胞性1例。经免疫表型检查，全部病例显示HLA—DR和B淋巴细胞主要标志，并伴有1种或1种以上Ig重链和单型性轻链表达，以K型为主，故均证实为B细胞单克隆性NHL。在13例作染色体核型检查的病例中有6例显示t(14;18)易位，其余病例为其他的核型异常。经两种探针检查，bc1-2重排出现在56%(10/18例)的滤泡型NHL的主要细胞亚型中，重排的病例都是通过一种探针和2种或2种以上的限制性内切酶证实其重排。而Ig重链的重排除说明为B细胞克隆性增生外，在10/11例bc1-2重排的病例中，bc1-2重排的基因片段与Ig重链JH重排基因片段是一起移动的，从而证实有t(14;18)易位存在。

25例NHL bc1-2重排及t(14;18)核型发生率与主要免疫标记表达率见表1。11例发生了bc1-2重排的病例中t(14;18)的检出率与CD_5^-、CD_{10}^+、$SIgG^+$、$SIgM^+$的出现率见表2。

讨 论

t(14;18)易位是淋巴造血系肿瘤中最常见的核型异常，分子生物学资料已显示，该易位是18号染色体上的原癌基因bc1-2易位到14号染色体上具有转录活性的免疫球旦白重链座位的结合区[1]。bc1-2基因至少有两个外显子，三个转录物分别为8.5kb、5.5和3.5kb，大多数18号染色体的断裂点发生于第2个外显子内[2]。通过对断裂点的分析发现，18q21的Bc-2基因有两个断裂点簇区(breakpoint cluster region)，即3′端未翻译区的Mbr和3′端的mbr[6]。

本组通过Mbr的PFL-1探针和mbr的PFL-2探针检测全部NHL病例，发现56%的滤泡型NHL和1/7例弥漫型NHL出现bc1-2重排。然而这两种探针对bc1-2重排的检测结果是不相同的，其中2/3的断裂点被PFL

表1 25例NHL Bcl-2重排及t(14;18)核型的发生率、主要免疫标记表达率

	PFL-1重排	PFL-2重排	PFL1+PFL-2重排	t(14;18)	CD_5^-	CD_{10}^+	$SIgG^+$	$SIgM^+$
滤泡型	7/18(39%)	3/18(17%)	10/18(56%)	6/13(46%)	16/18(89%)	11/18(61%)	6/18(33%)	12/18(67%)
弥漫型	1/7(14%)	0	1/7(14%)	1/7(14%)	4/7(57%)	2/7(29%)	1/7(14%)	5/7(71%)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 [illegible]例bcl-2重排病例中t (14;18) 核型及主要免疫标记表达结果

	PFL-1/PFL-2重排例数	t(14;18)例数	CD_5^+	CD_{10}^+	$SIgG^-$	$SIgM^-$
滤泡型	10	5	9	7	6	4
弥漫型	1	1	1	0	1	0

—1探针所测定，说明大部分bcl-2重排发生在Mbr区或接近Mbr[7]；其余的则发生在bcl-2基因的下游区域，即在mbr内。未见出现PFL-1和PFL-2同时重排的病例。本组结果低于Weiss报道[8]，而Weiss使用PFL-1、PFL-2和PFL-3三个探针。Tsujimoto也报道[8]用5′端探针可检测bcl-2基因的其他重排，为了提高检出率，是否可联合使用特异性探针需待证实。本组bcl-2重排不仅出现在滤沧型NHL中，在弥漫型NHL中的发生率尚需积累更多的病例。

本组大多数病例出现Ig重链的重排，说明肿瘤细胞为B细胞起源，在11例出现bcl—2重排的病例中，10例bcl—2重排的片段与Ig重链JH的重排片段是一起移动的，此证实为t(14;18)易位。但有一例未出现这种移动，严格地说是PFL—2探针所检测的病例，有报告指出[9]，一个bcl—2基因的变异易位和一种与JH片段不同的Ig区域与此有关。

部分病例的核型资料分析，在滤泡型NHL中t(14;18)易位的核型发生率为46%(6/13例)，而11例发生bcl—2重排的病例中，6例有t(14;18)核型。1例有t(14;18)核型的病例却无bcl-2重排出现。故今后应加强细胞遗传学与分子遗传学方面的联合检测。

从主要免疫标记的表达与bcl-2重排相关的分析可看到，在具有bcl-2重排的NHL中CD_{10}^+表达率高些:70%的重排标本CD_{10}^+，而60%的bcl-2胚系状态的标本CD_{10}^-。此外，在11例重排病例中，91%的病例CD_5^-，64%的病例表达单型SIgG，其中7/11例$SIgG^+/CD_5^-$。$SIgG^+/CD_5^-$与bcl-2重排的相关需进一步探讨。

本组实验表明，bcl-2重排与滤泡型NHL的发病有关，但不论使用何种探针，该重排与滤沧型NHL亚型之间的关系不明显。总之，在B—NHL中用bcl-2基因的分子探针方法对t(14;18)易位的检测是有意义的，它可准确地检测具有低增生性细胞NHL中这种易位的发生率，同时还能检测细胞遗传学方法不能测定的染色体结构异常，如微小缺失或复杂易位。此外还应观察bcl-2重排与NHL病程发展的关系，以便改善恶性淋巴瘤的诊断和分型的准确性，更好地了解bcl-2在致病中的作用。

(本研究由法国E.Herriot医院部分工作人员协助完成，在此致谢。)

参 考 文 献

1 Yunis JJ, et al. N Eng J Med 316:79, 1987
2 Tsujimoto Y, et al. Proc Natl Acad Sci USA 83:5214, 1986
3 Tsujimoto Y, et al. Science 226:1097, 1984
4 Southern EM. J Mol Biol 98:503, 1975
5 The non-Hodgkin's lymphoma pathologic classfocation project. National Cancer Institut sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas. Cancer 49:2122, 1982
6 Tsujimoto Y, et al. Proc Natl Acad Sci 84:1329, 1987
7 Bakhshi A, et al. Cell 41:899, 1985
8 Weiss LM, et al. N Engl J Med 317:1185, 1987
9 Adachi M, et al. Proc Natl Acad Sci 86:2771, 1989

(收稿日期 1994-01-20)

(下转86页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

16 Spivak W, et al.Biochem J 1986;234:101
17 Spivak W, et al.Biochem J 1985;225:787
18 姚新生,等编.有机化合物波谱分析 北京:人民卫生出版社 1983;72
19 Doumas BT,et al.Clin Chem 1985;31:1677
20 Kuenzle CC,et al.J Lab Clin Med 1966;67:294
21 Garber CC.Clin Chem 1981;27:1410
22 Vaughan Jun.JR,et al.J Amer Chem Soc 1952;74:676
23 金恒亮,编.高压液相色谱法 北京:原子能出版社 1987;177—229
24 高 潮,等译.现代液相色谱法导论 第二版 北京:化学工业出版社 1988;367
25 Jansen PLM,et al.J Chromatogr 1980;182:100

(收稿日期 1994-01-20)

BILIRUBIN SULFANILATE CONJUGATES-SYNTHESIS,PURIFICATION AND IDENTIFICATION

Peng Yongzheng, et al
Dept.of Laboratory Diagnosis

Bilirubin sulfanilate conjugates(BSC)were synthesized with the methods of Jirsa,Feng Rengfeng et al with some modifications.The product was purified with preparative column of high performance liquid chromatography(HPLC).

Infrared spectra(IR),mass spectrometry(MS),HPLC,thin layer chromatography(TLC),element analysis,visible absorption spectra and the diazo reaction method were used for the identification of structure and its character as well as the purity of the product.It is proved that this product contains bilirubin mono-and disulfanilate conjugates ,and its purity is 45-55%.The purified bilirubin mono-and disulfanilate conjugates are expeered to be used as surrogate calibrators for determining conjugated bilirubin.

KEY WORDS Bilirubin sulfanilate conjugates; Infrared spetra; Mass spectrometry; High performance liquid chromatography; Synthesis; Purification; Identification

(上接89页)

bcl-2 GENE REARRANGEMENTS IN B-Non-Hodgkin ' s LYMPHOMA

Feng wenli, et al
Faculty of laboratory medicine

Southern blotting was used to detect rearrangemects of the bcl-2 gene by the two probes for chromosome 18-specific DNA fragments and for immunoglobulin hearychain joining region fragment on chromesome 14 in 25 cases of B-NHL, also, immunophenotype and karyotype. In the present study, bcl-2 gene was rearranged in 56%(10/18)of follicular lymphomas and 15%(1 of 7)of diffuse lymphome of follicle cneter cell lineage.10 of 11 the rearranged bcl-2 fragment comigrated with a rearranged immunoglobulin heary chain joining region fragment, confirming that is t(14,18) translocation. Our results show that the rearrangement of bcl-2 associated with the pathogenesis of follicular lymphoma.

KEY WORDS non-hodgkin ' s lymphoma; bcl-2 gene; rearrangement