维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷 第4期 重庆医科大学学报 Vol. 19 No. 4
1994 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1994

270-273.4

克隆分析用于MDS早期诊断的初步研究
——用PCR技术和x染色体联锁的PGK基因RFLP及甲基化的分析法

R551.304
R446.61

第二医院内科 张 玲
Leeds General Hospital U·K Angela Kelly

提 要 用PCR技术和x染色体联锁的PGK基因的RFLP及甲基化分析方法，分别对300例老年、200例中青年、无血液系统疾病的女性进行了外周血细胞的克隆研究。PGK基因的RFLP检出率老年组为32.7%，中青年组为32.5%。克隆分析：中青年组均为多克隆，老年组发现5例有克隆变异，其中一例随访发现有外周血细胞异常，疑为MDS。此方法可能对MDS的早期诊断有一定价值。

关键词 骨髓增生异常综合征；PCR；磷酸甘油酸激酶；限制性片段长度多态性
中图分类号 R446.61；R394.3

骨髓增生异常综合征(MDS)是一种造血干细胞的克隆性疾病，主要发生于老年人群中[1]。在我们近期对MDS研究中，随机选择了一组老年无血液系统疾病的女性病人作为对照，偶然发现个别妇女外周血细胞有克隆变异，这是否为恶性病变的亚临床期，分析细胞的克隆性能否对疾病的早期诊断提供依据。为探讨这一问题，我们对两个年龄组(18～45岁、55～90岁)女性、无血液系统疾病，外周血细胞计数正常、无放疗化疗史的病人，用PCR技术和x染色体联锁的磷酸甘油酸激酶(PGK)基因片段的限制性片段长度多态性(RFLP)及甲基化的分析方法进行了外周血细胞的克隆研究。

在正常成年女性的体细胞中，仅一条x染色体有活性，另一条为灭活的。这种灭活形式是随机地发生在胚胎形成的早期阶段，并以稳定的形式传给子代细胞[2,3]，即正常细胞群中来自母系和父系的活性x染色体各占50%。而瘤细胞群为一单一细胞来源，活性x染色体仅来自母系或父系。这种x染色体的随机灭活表现为联锁的基因部位胞嘧啶残基的甲基化改变[4]。用甲基化敏感的限制性内切酶(如Hpa2)可以识别，再利用另一内切酶Bstx1测定PGK基因的RFLP，便可检测细胞的克隆性。

材料与方法

1、研究对象 老年组300例55～90岁(平均年龄65.3岁)；中青年组200例18～45岁(平均年龄38.1岁)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

两个年龄组均为无血液系统疾病临床症状、外周血细胞计数正常、无放疗化疗史的女性病人。(均由英国 Leeds General Hospital 提供)

2、方法

(1)DNA 的提取:

取外周血 1～2ml,肝素抗凝。0.86M 氯化铵溶解红细胞,蛋白酶 K 消化过夜,按经典的酚/氯仿法提取 DNA[5]。

(2)PCR 扩增及 RFLP 的检测:

PCR 引物:根据 Kamp H. 等报导的序列合成[6]引物 A_1、B_3(Applied Biosystems 寡核苷酸合成仪)。碱基序列:A_1 为 5'—TGT TCC GCA TTC TGC AAG CC—3';B_3 为 5'—TAT CCT TTT GTG CAG GAA CC—3',扩增 x 染色体联锁的 PGK 基因片段,为 619bp 产物,其中有消化酶 $Bstx_1$ 和两个 Hpa2 酶的切点(见图 1)。



图 2 PGK 基因片段的 RFLP 检测。PCR 扩增后的 DNA 用 Bstx1 酶消化,"杂合子"显示 619bp 和 559bp 两个片段(bp 表示碱基对)。

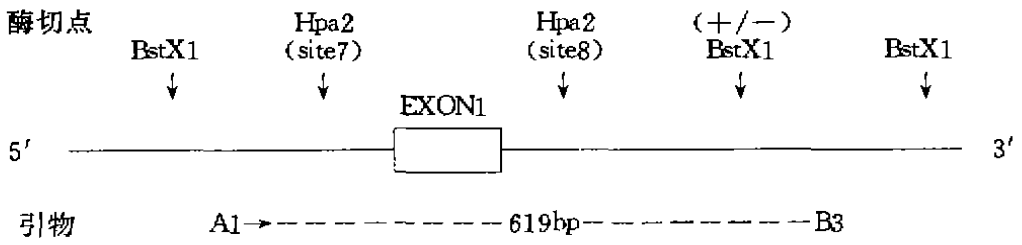


图 1 x 染色体上 PGK 基因片段示意图

PCR 在 MJ Research Programmable Thermal controller 上进行,93℃1 分钟;56℃1 分钟'72℃1 分钟,扩增 30 个循环。每当反应管加入 1μl DNA(约 60～200ng)、引物 A_1/B_3 各 0.5μl、0.2mMdNTP(Promega 公司)、1u Taf 多聚酶及 Taq Buffer(Promega 公司)至总量 50ul。PCR 扩增完后,取其部分产物用溴化乙锭染色的 2%琼脂糖电泳,100bp DNA Ladder 作长度标志,紫外灯下显示 619bp 的区带。用限制性内切酶 Bstx1(Northumbria Biologicals LTD u·k)消化 PCR 产物(45℃15～18 小时)。2%琼脂糖电泳分离 DNA 片段,在研究对象中可见有些个体有两条区带(619bp 和 559bp),称之为"杂合子")(见图 2)。

3. 克隆分析

取 0.4ug"杂合子"的 DNA,用 25u 内切酶 Hpa2(Northumbria Biologicals LTD U·K)预消化(37℃15 小时),未经预消化的同一 DNA 标本作克隆分析对照,对照的和经 Hpb2 预消化的 DNA 同时进行扩增,各取 20μl(扩增后产物用 Bstx1 酶消化,2%琼脂糖电泳分离,显示克隆分析结果。

结　果

中青年组 200 例中"杂合子"有 64 例,检出率 32.5%;老年组 300 例中"杂合子"有 98 例,检出率 32.7%。中青年组 64 例"杂合子"的细胞克隆分析均为多克隆形式,即用 Hpa2 酶预消化后仍保持清晰的两个区带。老年组 98 例"杂合子",93 例为多克隆,5 例为单克隆,即用 Hpa2 酶预消化后只有一个区带(见

维普资讯 http://www.cqvip.com

图3)。老年组"杂合子"中克隆变异发生率为5.1%。



图3 用PCR方法做外周血细胞的克隆分析(选自两例老年组妇女),标记B为仅用Bstx1消化后的DNA片段,标记H为Hpa2和Bstx1两种酶消化后的DNA片段。例2为克隆变异。

讨 论

近年来,许多学者对MDS的病因、发病机理及细胞遗传学、分子生物学等方面进行了研究。认为此病是造血干细胞受到损害后发生克隆变异所致。一些学者也先后应用x染色体灭活分析和Southen Blotting或PCR技术,对确诊的MDS病人进行过细胞的克隆研究,均证实了其克隆变异的特征[7,8,9]。但由于此病起病大多为亚急性或慢性,缺少特异症状,不典型病例可以很少有血液学的异常,因此最早期的MDS易被忽视或漏诊[10]。目前尚无早期诊断的方法。从我们先前的发现提示,能否通过检测细胞的克隆性,为疾病的早期诊断提供信息,因此我们对较大数量的中青年和老年无血液系统疾病、无放疗化疗史的女性病人进行了血细胞克隆分析。结果老年组和中青年组RFLP检出率分别为32.7%和32.5%,与Vogealstein[11]等报导的结果相符合。中青年组克隆分析结果均为多克隆,这进一步支持原发性MDS多见于老年人群中,在中青年中发病率极低。老年组98例"杂合子"中发现5例单克隆,对这5例妇女进行了随访,包括定期检测血细胞计数和细胞形态学改变。其中已随访6个月的一例出现了原因不明的外周血红细胞和粒细胞计数轻度减低,形态学观察偶见大小不匀的红细胞,骨髓细胞增生无异常,疑为MDS的早期改变。其它随访未到4个月的几例尚无异常发现,仍在随访中。如果我们的发现在随访过程中得到证实,这将为此病在女性"杂合子"人群中的早期诊断提供一个有价值的方法。

我们采用了PCR技术和x染色体灭活性及PGK基因的RFLP分析方法,它具有快速、简便、敏感性高和取材少等优点,适合较大数量人群的研究,也适用于白细胞减少的病人及细胞亚群的克隆性研究。但此方法也有一定局限性,只适用于女性人群的研究,而PGK基因的RFLP发生率相对较低,检测范围受到限制。尽管存在这种不足,此方法仍被成功地应用于许多血液系统疾病和非血液系统疾病的研究中[7,8,9,11,12],值得进一步探讨。

(本题目是在英国Leeds General Hospital完成)

参 考 文 献

1 Jacobs A. Clin. Path 1985;38:1201-1217

2 Gartler S. M. et al. Annu. Rev. Genet 1983; 17: 155—190

3 Lyon M. F. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 1972; 47:1-35

4 Cantoni G. L. et al. Chemistry, biochemistry, and biology of DNA methylation. New York, Alan R. Liss 1985

5 Sambrook J. et al. Molecular Methods: a laboratory manual — 2nd ed. Cold Spring Harbour Press 1989; P. E3

6 Van Kamp H. et al. Nucleic Acids Researdh 1991;19:2794

维普资讯 http://www.cqvip.com

7 Janssen J. W. G. et al. Blood 1989;73:248
8 Tefferi A. et al. Blood 1990;75:1770
9 Van Kamp H. et al. Blood 1992;80:1774
10 郁知非,等. 现代血液学 白细胞及血小板凝血因子疾病分册,第一版,浙江科学技术出版社,1992:83—91
11 Vogelstein B. et al. Cancer Res. 1987;47:4806
12 Yoffe G. et al. Leukaemia 1987;1:226

(收稿日期 1994—03—09)

STUDIES ON EARLY DIAGNOSIS OF MDS BY CLONAL ANALYSIS ——USING PCR TECHNIQUE AND X-LINKED RFLP-METHYLATLON ANALYSIS

Zhang ling, et al
Dept. of Intemal Medicine, The Second Hospital

Clonal study of peripheral blood cells in 300 elderly and 200 middle-aged females without haematological disorders was performed by PCR technique and X-linked RFLP of PGK gene-methylation analysis. The frequency of the PGK of polymorphism was 32.7%and 32.5% in elderly and middle-aged groups respectively. Clonal hacmopoiesis was not fourd in middel-aged group, but could be seen in 5 individuals of eldefly group and one of them has show the abnormakuty of peripheral blood cells as MDS during following up. The result suggests this study may provide early information on sub-clinical malignant changes.

KEY WORDS Myelodysplastic syndrome; Polymerase chain reaction; Phsophoglycerate kinase gene; Restriction fragment length polymorphism

(上接 276 页)

THE EFFECT OF NEW QUINOLONES ON HEPATIC MICROSOMAL CYTOCHROME P—450 IN RAT LIVER

Mo Lan, et al
Dept. of Infectious Diseases, the First Hospital

Several new quinolones have been developed and used as effective antibacterial agents to treat a variety of infections, It was reported that new quinolones might inhibit the activities of hepatic microsomal enzymes. In this report, the effects of enoxacin and norfloxacin on rat hepatic microsomal cytochrome P—450 were investigated.

Hypnotic time induced by sodium pentobarbital was significantly prolonged in rats with enoxacin (200mg/kg, qd×7d), while it was only slightly prolonged with norfloxacin. Enoxacin (200mg/kg, qd×7d) markedy inhibited liver microsomal cytochrome P—450, but norfloxacin did so slightly. The results strongly suggest that enoxacin markedly and norfloxacin slightly inhibited the activities of cytochrome P—450 in liver microsomes.

KEY WORDS enoxacin; norfloxacin; liver microsomal; cytochrome P—450