DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.07.027
第25卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 7
2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

文章编号:1000-5404(2003)07-0629-03

论著

PCR-SSCP检测急性白血病患者N-ras基因突变及临床意义初探

刘 红[1],彭家和[2],江 渝[2],钟小林[2],曹廷兵[2],张 立[2],何凤田[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院血液科,重庆 400037;[2]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨N-ras基因突变与急性白血病发生的关系。方法 采取骨髓和外周血白细胞提取DNA,用PCR-SSCP分析技术分别对急性白血病患者、正常对照组的N-ras基因突变进行检测。结果 84例急性白血病患者中25例发生N-ras基因突变,基因变异频率为29.8%,其中急性淋巴细胞白血病为18.6%,急性髓细胞白血病为41.4%;11例随访6个月,7例N-ras基因突变消失,4例N-ras基因突变持续存在;正常对照组未发现N-ras基因突变。结论 N-ras基因突变对急性白血病患者的预后具有一定的参考价值。

关键词:N-ras基因;急性白血病;突变
中图法分类号:R733.71;Q754;R446.9 文献标识码:A

Clinical significance of the detection of N-ras gene mutation in patients with acute leukemia by PCR-SSCP

LIU Hong, PENG Jia-He, JIANG Yu, ZHONG Xiao-lin, CHAO Ting-bing, ZHANG Li, HE Feng-tian (Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between N-ras mutation and the pathogenesis of acute leukemia. Methods Human genomic DNA was extracted from normal human peripheral white blood cell and bone marrow of patients. N-ras gene mutations in 84 cases of acute leukemia and 50 normal healthy cases were detected by PCR-SSCP technique, respectively. Results N-ras gene mutations were found in 25 cases out of 84 cases of acute leukemia with the frequency of N-ras gene variation being 29.8%, including 18.6% of acute lymphoblastic leukemia (ALL) and 41.4% of acute myelocytic leukemia (AML). After a follow-up of 11 cases for 6 months, disappearance of N-ras gene mutation was found in 7 cases but continuous presence of N-ras gene mutation was found in 4 cases. However, no N-ras gene mutation was found in 50 normal healthy cases. Conclusion N-ras gene mutation is of important significance in the prognosis of patients with acute leukemia.

Key words: N-ras gene; acute leukemia; mutation

随着近年来分子生物学技术的发展,阐明了一些影响到细胞增殖、凋亡及癌变的基因变化。在血液恶性肿瘤中可见ras基因的异常表达。ras基因的激活方式以点突变为主[1,2]。我们应用聚合酶链反应(PCR),单链构象多态分析(Single strand conformation polymorphism, SSCP)技术对急性白血病患者的N-ras基因突变进行了检测,初步分析了急性白血病患者的预后。现将结果报道如下。

1 对象和方法

1.1 研究对象

急性白血病患者84例[急性淋巴细胞白血病(ALL)43例,急性髓细胞白血病(AML)41例]95份标本,均为我科2000年7月至2002年9月住院病人,其中男40例,女24例,年龄3~68岁,均经临床、血常规和骨髓检查确诊,符合诊断标准[3],其中11例N-ras基因突变患者随访6个月以上;以50名正常献血员的外周血作对照组。

1.2 方法

1.2.1 DNA的提取 按常规酚-氯仿法[4]从骨髓和外周血白细胞中提取DNA,经电泳鉴定为完整的基因组DNA,置于-70 ℃备用。

1.2.2 PCR扩增 以上述提取的样品DNA为模板,应用Minicycler PCR扩增仪(MJ. Research. USA)扩增N-ras外显子1基因片段[4]。所用引物(由上海生工公司合成)的序列为:5′-GACTGAGTACAAACTGGTGG-3′(上游),5′-CTCTATGGTGGGATCATATT-3′(下游)。扩增条件为92 ℃变性60 s,55 ℃退火60 s,72 ℃延伸60 s,共进行35个循环,扩增体系总量为50 μl。扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳,用溴乙锭染色观察。

1.2.3 SSCP分析PCR产物 PCR产物5 μl加变性液5 μl,

作者简介:刘 红(1960-),女,河南省新乡市人,副主任医师,副教授,主要从事白血病发病机制方面的研究,发表论文17篇。电话:(023)68755609
通信作者:江 渝,电话:(023)68752261
收稿日期:2002-12-26;修回日期:2003-02-28

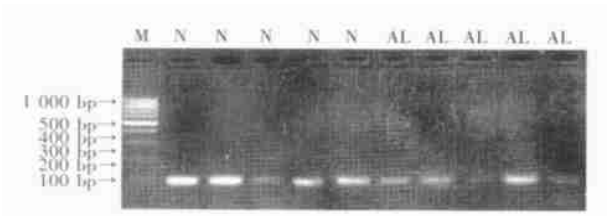
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

100 ℃变性 5 min，取出立即置冰浴上，上样于 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(Bio-Rad 公司)，电压 160 V，3～4 h，2%硝酸银染色 30 min，弃染色液，加入 2.5% Na_2CO_3 和体积分数为 0.1% 的甲醛的混合液，显色至胶中出现清晰电泳条带后，弃显影液，加入 10%醋酸液中固定，照相分析[5]。

2 结果

2.1 PCR 扩增 N-ras 基因

正常对照组外周血白细胞和急性髓细胞白血病患者白细胞 DNA 经 N-ras 基因第 1 外显子上、下游引物引导扩增后，琼脂糖凝胶观察出现大小为 109 bp 片段，见图 1。



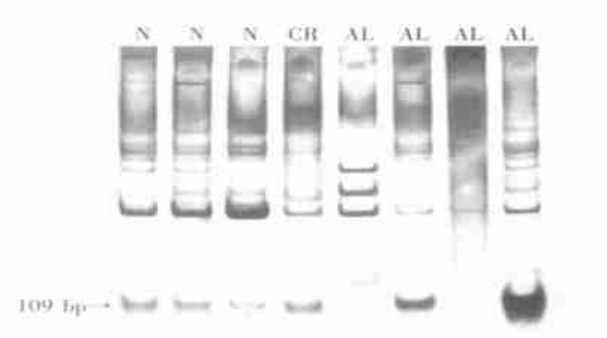
M：Standard molecule；N：Normal control；AL：Acute leukemia

图 1 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物

Fig 1 Identification of the PCR product by DNA agarose gel eletrophoresis

2.2 N-ras 基因突变情况

根据SSCP 电泳结果，正常对照组 N-ras 外显子 1 PCR 扩增产物为一整齐的条带，未见基因突变。而急性白血病 84 例中 25 例的 N-ras 基因外显子 1 PCR 扩增产物通过 SSCP 电泳出现异常的条带，即泳动速度比正常对照组快，见图 2。表明这 25 例急性白血病患者存在N-ras 基因突变，突变率为 29.8%，其中 ALL 8 例出现 N-ras 基因突变，AML 17 例 N-ras 基因突变，突变率分别为 18.6%和 41.4%；在 25 例急性白血病中 11 例随访 6 月，其中 7 例(5 例为 AML，2 例为 ALL)N-ras 基因突变患者在临床缓解之后，ras 基因突变消失；4 例(3 例为 AML，1 例为 ALL)例患者随访 6 个月后，其 N-ras 基因突变持续存在。



N：Normal control；CR：Complete clinical remission；AL：Acute leukemia

图 2 PCR-SSCP 分析 N-ras 基因外显子 1

Fig 2 Analysis of N-ras gene exon 1 by PCR-SSCP

3 讨论

ras 基因家族包括 H-ras，K-ras 和 N-ras 3 种。这 3 种 ras 基因在核酸序列上的差异性较大，但所编码的蛋白质极为相似，均为 P21 蛋白。P21 蛋白与质膜表面功能有关，可以结合鸟嘌呤核苷酸(GDP 和 GTP)，同时具有 GTP 酶活性。当 ras 基因突变时，GTP 酶活性降低，打破了 GDP 与 GTP 之间的动态平衡，使 Ras 蛋白一直处于活化状态，信号传导持续流动，导致细胞转化而具有恶性潜能。ras 基因突变是造血系统肿瘤中最常见的癌基因异常之一，ras 基因的高表达可能与细胞的分化启动有关。Darley 等[6]发现人类 CD34 细胞表达突变的 N-ras，采用流式细胞仪分析证明此细胞处于 $S+G_2$、M 期的比例降低，细胞分化趋势减弱，过度生长增殖，增加了细胞和组织的恶变几率。

本实验 84 例急性白血病有 25 例 N-ras 突变，突变率为 29.8%，其中 43 例 ALL 有 8 例 N-ras 基因突变，占 18.6%；41 例 AML 有 17 例突变，占 41.4%；根据 N-ras 基因突变发生的时间不同，将急性白血病患者分为两类：第一类是 N-ras 基因突变发生于多能干细胞阶段，因而突变普遍存在于骨髓细胞和外周血细胞，这类患者即使临床症状消失仍带有 N-ras 基因突变。第二类是在急性白血病的发病过程中产生 N-ras 基因突变，带有 ras 基因突变的细胞是一变异的白血病细胞克隆，这类患者可通过治疗去除带有突变的细胞，并在临床症状消失后不再出现[7]。本研究中在 25 例 N-ras 基因突变患者中有 11 例随访 6 个月以上；7 例患者经化疗病情缓解，N-ras 基因突变消失(5 例 AML，2 例 ALL)。表明这 7 例急性白血病的发生可能属于上述第二类白血病。4 例急性白血病患者经化疗后病情缓解其 N-ras 基因突变持续存在，这些患者可能属于上述第一类急性白血病，往往提示预后不良。

SSCP 具有省时，操作简便，成本低，检测灵敏度较高，不受PCR 扩增差异影响的优点，适于大样本筛查，可有效检测 PCR 产物中两侧引物间的基因变异，对已知及未知基因变异的检测均有效。单链 PCR 构象多态性(SSCP)是一种简便有效的鉴定扩增 DNA 序列变化的技术。本项研究利用 PCR-SSCP 技术检测急性白血病 N-ras 基因突变，其突变的电泳结果表现有电泳位置的改变，条带含量的变化等。作为急性白血病缓解与否的分子标志，对临床完全缓解(CR)期内的急性白血病患者，骨髓内原始细胞小于 5%，形态学方法难以辨认正常原始细胞和白血病细胞[5]，用 PCR-SSCP 检测微小残留病(MRD)的 N-ras 基因突变新出现或再出现，则预示白血病可能复发，对指导临床治疗及预后

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

判断有着重要参考价值。

参考文献：

[1] Kiyoi H, Nave T, Nakano X, *et al*. Prognostic implication of FLT3 and N-ras gene mutations in acute myeloid leukemia[J]. Blood, 1999, 93(9): 3074—3080.

[2] Weijæn S, Veiders M P, Kast W M. Modulation of immune response and tumor growth by activiated Ras[J]. Leukemia, 1999, 13(4): 502—508

[3] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科技出版社, 1999. 172—185.

[4] CW 迪芬巴赫, GS 德维克斯勒 主编. 黄培堂 译. PCR 技术实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 173—178.

[5] Mortazavi Y, Tooze J A, Gordon-Smith E C, *et al*. N-ras gene mutation in patients with aplastic anemia and aplastic anemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria during evolution to clonal disease[J]. Blood, 2000, 95(2): 646—650

[6] Darley R L, Hoy T G, Baines P, *et al*. Mutant N-RAS induces erythroid lineage dysplasia in human $CD34^+$ cells[J]. J Exp Med, 1997, 185(7): 1337—1347.

[6] Horiike S, Misawa S, Kaneko H, *et al*. Double mutations of the N-ras gene in a patient with acute myelomonocytic leukemia[J]. Int J Hematol, 1995, 61(4): 205—213.

（编辑 栾 嘉）

文章编号：1000-5404(2003)07-0631-01

个案与短篇

脑包虫病 1 例

A case report of cerebral echinococcosis

胥全宏，冯 华，高伯元，吴 南 （第三军医大学附属西南医院神经外科，重庆 400038）

患者，男，49 岁。因头痛头昏半年，加重 2 周入院。自诉于半年前始，无明显原因出现头痛头昏，头痛以左顶部为明显，为持续性胀痛，可忍受。无恶心、呕吐，无畏寒，发热，无肢体抽搐及意识障碍。两周来头昏，头痛加重，伴说话迟缓，费力。曾有新疆牧区多年生活史，有食生肉史。查体：生命体征正常，语言略迟缓，双侧瞳孔等大同圆 3 mm，光反射灵敏，双侧视乳头轻微水肿，无面舌瘫，四肢活动自如，感觉正常，右侧巴彬斯基征(+)，颈软，Kernig 征(−)。CT 示：左颞叶白灰质交界处多发分隔性囊性病灶，大小约 4.7 cm×3.9 cm，病灶后缘可见小片强化，病灶周围未见明显水肿，左侧侧脑室轻度受压变形。腹部 B 超未见异常，X-线胸片正常，肝功，肾功，血常规及大便常未见异常。初步诊断为：左颞叶胶质瘤。于全麻下行手术，见皮层表面无明显异常，切开颞叶皮层约 3 cm 深，见 3 cm×4 cm 大小透明囊肿 3 个，包膜呈微白色半透明粉皮状，其内充满无色透明囊液。生理盐水冲洗术野后，囊肿即漂浮起来。病理：肉眼观察，囊肿分内外两层，为白色、胶样、半透明状；镜下可见红染、相互平行的板层样结构及单层细胞排列结构；考虑脑包虫病。术后予以阿苯达唑及吡喹酮治疗口服抗寄生虫治疗 2 周，患者症状消失，神经系统查体正常，复查 CT 见囊性占位已完全消失。

讨论

脑包虫病，为自然疫源性疾病，有较强的地域分布特点，主要流行于畜牧区，患者有与疫源地密切接触史，多伴有肝脏、肺脏感染；有原发型和继发型两类，主要临床表现为颅内压增高及癫痫发作，视病变部位、大小等不同可有偏瘫、失语、偏身感觉障碍等不同局灶性体征[1]；CT 表现多为脑内圆形或类圆形囊肿，边界锐利，无囊周水肿、占位征象，囊内容物水样密度，一般不能分辨子囊。在脑包虫病非流行地区，脑包虫病散发病例并不多见，术前很易将“脑包虫病”误诊为“胶质瘤”或其他疾病。该例患者术前初步考虑为“胶质瘤”，首先在于重庆地区为脑包虫病低发区，对脑寄生虫方面疾病认识不够，术前对患者“曾有多年牧区生活史，有食生肉史”的生活史未引起足够重视，未行寄生虫类疾病方面的进一步相关检查；其次该例患者病灶为单发，无肺部、肝脏等相应病变，且为离开牧区多年后发病。胶质瘤与脑包虫病的手术方式与术后治疗有着原则性的不同，一旦遇见可疑病例，如有牧区生活史，CT 表现为脑内囊性病变者，即应引起高度重视，应行进一步血嗜酸细胞计数，皮内试验及血液寄生虫免疫学试验等检查，以争取术前明确诊断[2]；若术前未能诊断为脑包虫病，而术中见到包膜呈微白色半透明粉皮状，其内充满无色透明囊液的脑内囊性病变，则应高度怀疑“脑包虫病”的可能，术中须严防囊肿破裂，囊液外渗，可用“漂浮法”完整摘除囊肿，并用高渗盐水及 3%过氧化氢反复冲洗术野；术后明确诊断为“脑包虫病”后，即给予阿苯达唑等抗寄生虫药物，大剂量、长时程口服，多可取得良好预后。

关键词：脑包虫病；胶质瘤
中图法分类号：R532.32 文献标识码：B

参考文献：

[1] 王忠诚. 神经外科学[M]. 武汉：湖北科学技术出版社，1998. 762—763.

[2] Taratuto A L, Venturiello S M. Echinococcosis[J]. Brain Pathol, 1997, 7(1): 673—679.

（编辑 薛国文）

作者简介：胥全宏(1971—)，男，四川省彭州市人，硕士研究生，医师，主要从事颅脑外伤方面的研究。电话：(028)38840 17

收稿日期：2001-06-29；修回日期：2002-01-17

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net