DOI:10.16016/j.1000-5404.1998.04.033

经验交流

用链亲和素-胶体金原位杂交方法检测白血病多药耐药基因的表达

The expression of leukemic cell MDR1 gene detected by SAG-ISH

张 勇* 张一军 夏顺中 周成康 (第三军医大学附属西南医院血液内科) 重庆,400038

提 要 **目的**:检测白血病患者骨髓单个核细胞多药耐药基因(MDR1)的表达。**方法**:链亲和素-胶体金原位杂交(SAG-ISH)。**结果**:52例患者中24例(46.2%)MDR1呈阳性表达,其中初治组阳性10/28=35.7%,复发难治组12/18=66.7%,两组相差显著($P<0.05$)。持续完全缓解组1/4=25.0%。**结论**:SAG-ISH检测MDR1方法简便,敏感且特异,并能准确定位,可预测白血病对化疗的敏感性及预后,为制定化疗方案提供依据。

目前治疗白血病的主要方法仍为化疗,而化疗成功的主要障碍之一是白血病细胞对化疗药物的交叉耐药性。1970年Biedler和Riehm首次描述了肿瘤细胞多药耐药性(Multidrug resistance, MDR),现已证明MDR家族是由MDR1和MDR3组成,但仅MDR1及其基因产物起着多药耐药性的作用。国内外不少学者用RT-PCR[1]、Northern杂交[2]、Slot印迹杂交[3]等多种方法检测了白血病多药耐药基因(MDR1),但选择链亲和素-胶体金原位杂交(Streptauidin gold *in situ* hybridization,SAG-ISH)检测MDR1的报道不多[4]。我们采用光敏生物素(Ag)标记MDR1 cDNA探针,以链亲和素(Ab)-胶体金为检测系统作骨髓中单个核细胞的原位杂交,现将结果报道如下。

1 材料与方法

病例:1995年5月至1997年2月住院治疗的急性白血病50例和慢性粒细胞白血病急变2例。其中急性髓细胞白血病(AML)30例,急性淋巴细胞白血病(ALL)20例;初治组28例,复发难治组18例,持续完全缓解组4例;男性33例,女性17例;年龄8~73岁,中位数年龄42岁。全部病例均符合国内1986年天津会议确定的诊断标准和1987年苏州会议确定的疗效标准。

主要试剂:MDR1 cDNA(157 bp)探针,光敏生物素及链亲和素-胶体金,均由北京军科院附属307医院提供;淋巴细胞分离液由上海生化试剂厂提供;其余试剂自行配制。

标本制备:抽取2 ml骨髓液,肝素抗凝,淋巴细胞分离液梯度离心,制备单个核细胞,调细胞浓度至(2~3)×10^5/L,离心涂片机甩片,玻片风干30 min,-20℃密闭保存备用。

原位杂交(ISH):细胞甩片自然风干,4%多聚甲醛室温固定10 min,蛋白酶K(4 μg/ml、50 μl/片)消化15 min,乙醇系列梯度脱水,风干玻片,每片加杂交液50 μl(先经煮沸变性5 min,然后迅速置冰中冷却),盖上封口膜,42℃湿盒中杂交6 h~166 h或过夜。取出玻片,洗Ⅰ(2×SSC-0.1% SDS)和洗Ⅱ(0.2×SSC-0.1% 6SDS)分别洗片,3%BSA室温封闭25 min,弃封闭液,加链亲和素—胶体金50 μl/片室温孵育45 min,1×PBS和双蒸水分别漂洗2遍,暗室内银显影5 min~10 min,蒸馏水洗片,苏木素或伊红复染,光学树脂胶封片,镜检。阳性结果判定:细胞浆中散在或满布黑褐色颗粒;阴性结果判定:细胞浆中无黑褐色颗粒。阳性对照设置:设置一含已知靶序列曾用该探针做原位杂交获阳性结果的细胞;阴性对照设置:不加探针的对照。

统计学处理采用χ^2检验。

2 结果

白血病骨髓单个核细胞MDR1基因的表达:52例中有24例MDR1阳性,阳性率24/52=46.2%。其中初治组10/28=35.7%,复发难治组12/18=66.7%,持续完全缓解组1/4=25.0%。阳性率初治组与复发难治组相差显著($P<0.05$)。AML和ALL两组MDR1阳性率差异不显著。

3 讨论

在MDR1的检测方法中以PCR和ISH较为敏感和可靠。Brophy[5]比较了原位杂交、RT-PCR、免疫细

* 张 勇,男,31岁,主治医师,硕士

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

胞化学、Slot blot 等技术在小儿 ALL 和淋巴瘤细胞中 MDR1 基因的表达，认为 RT-PCR 和 ISH 在敏感性和特异性相近，并优于 Slot blot 和免疫细胞化学(ICC)。Helen 比较了多种检测 MDR1 的方法，Driscoll 用 ISH 和 PCR 技术检测了 MDR 细胞的基因表达，Dietel 用 PCR 的各种技术形式(包括原位 PCR)讨论了 PCR 在病理诊断中的价值，均一致认为 PCR 和原位杂交技术具有最高的阳性表达和协调一致性。我们的体会是 SAG-ISH 方法简单实用，杂交信号定位准确，一般的实验室即可开展，并避免了同位素的放射性污染问题，具有较广泛的应用前景。

由于原位杂交检测 MDR1 的报道不多，目前国内外尚无统一的原位杂交检测 MDR1 阳性的标准。杜氏[4]建议以阳性检出率大于 15% 为标准，并提出细胞阴性、弱阳性、阳性、强阳性的反应强度分级。我们的体会是阳性信号的强度与检测技术(如显影的时间、浓度、温度等)关系密切，尚须统一显影条件、杂交液体积、洗液的浓度、时间等多种因素，并进一步扩大病例数量进行研究为宜。

总之，SAG-ISH 不失为一种检测白血病细胞 MDR1 的好方法，MDR1 的检出在化疗中的作用应充分重视。

关键词 药物耐受性；白血病；原位杂交；链亲和素-胶体金

中图法分类号 R733.7

参考文献

1 齐君原，武永吉. 用 RT-PCR 法检测急性白血病患者 MDR1 基因表达. 临床血液学杂志，1996；9(3)：110

2 孙桂香，李惠芳，王观武等. 多药耐药基因在白血病细胞中的表达. 中华血液学杂志，1994；15(2)：61

3 Lin S F, Huang S M, Chen T P *et al*. MDR1 gene expression in acute myeloid leukemia: clinical correlation. J Formos Med Assoc, 1995; 94(3): 111

4 杜跃斌，艾辉胜，王桂林等. 链亲和素－胶体金原位杂交检测白血病多药耐药基因表达. 实验血液学杂志，1996；4(3)：299

5 Brophy N A, Marie J P, Rojas V A *et al*. Mdrl gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemias and lymphomas: a critical evaluation by four techniques. Leukemia, 1994; 8(2): 327

(收稿：1997-04-29；修回：1998-03-05)

(编辑 刘 鹏)

对离子通道电活动记录中噪声变化的初步探讨

Preliminary study on the changes of background-noise in single ionic channel recording electrical activity

叶本兰* 舒崇湘** 程天民** 萧家思 (第三军医大学基础医学部生理学教研室) 重庆，400038

提 要 **目的**：研究放烧复合伤后血清成分对培养心肌细胞 L-型钙离子通道活动作用中膜片电活动背景噪声的变化，并初步探讨离子通道电活动记录中噪声的变化。**方法**：膜片钳离子通道 Cell-attached 记录法。**结果**：伤后血清低分子成分作用于心肌细胞，除使通道开放增加外，还使膜片噪声增加，阻断钙通道后，伤后血清成分仍可使膜片噪声增加，该作用有浓度依赖性与可逆性。**结论**：膜片电活动背景噪声与膜的生物物理学特性有关，膜片噪声的变化可能在一定程度上反应膜的功能状态的改变。

在记录离子通道活动时，一般要求尽量减小背景噪声，实验中噪声增加被认为是膜片与微管电极之间形成的高阻封接松脱等系统性误差增加[1]，但我们在实验中发现并非完全如此。在对放烧复合伤后血清低分子物质影响培养心肌细胞 L-型钙离子通道活动的研究过程中发现放烧复合伤血清低分子成分在影响通道活动的同时背景噪声也有变化[2]，因此，本研究进一步观察不同浓度的放烧复合伤低分子成分对膜片噪声

* 叶本兰，女，34岁，讲师，博士

** 预防医学系防原医学教研室，全军复合伤研究所

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