

慢粒白血病中 c-abl 癌基因的重排*

李洪 吴谨绪** 孙芝琳

(华西医科大学生物化学教研室,成都)

提 要

作者采用 α -³²P-dCTP 标记的 v-abl 癌基因探针与 7 例慢粒白血病细胞 DNA 的 Pvu II、Hind III 和 Bgl II 酶切片段杂交。结果发现其中 3 例慢粒病例的 Pvu II 和 Hind III 酶切杂交图谱与正常对照相比有明显变化,且 Pvu II 酶切位点有多处改变。表明在慢粒白血病中,Ph 染色体重排亦可累及 c-abl 癌基因内部,并可能有 多次多点重排发生。

关键词 慢粒白血病,c-abl 癌基因,基因重排,v-abl 探针,Southern 印迹杂交

慢粒白血病是以粒细胞及其前体细胞增生为特征的一种肿瘤性疾病。在 95% 以上的病例中,均可检出一种特异的 Ph 染色体^[1]。这种异常染色体系由 9 号和 22 号染色体的相互重排所致,其结果是原来分别位于 9 号和 22 号染色体上的 c-abl 和 c-sis 癌基因发生了相互易位^[2,3]。9 号染色体上的易位断裂点通常位于 c-abl 癌基因的上游,离该基因的第一外显子 1.4 kb 以上^[2]。易位到 22 号染色体上的 c-abl 癌基因与 bcr 基因融合,并进而表达一种具有酪氨酸蛋白激酶活性的融合蛋白质,与慢粒白血病的发生密切相关^[4,5]。本文试图通过分析 c-abl 癌基因的限制性内切酶谱,以探讨慢粒白血病细胞中 c-abl 癌基因重排的分子机制。

材 料 和 方 法

一、材料和试剂

慢粒白血病病例 由华西医大附一院内科血液病室提供。病例经临床、骨髓细胞学及 Ph 染色体检查确诊。其中病例 4 为急变期,其余均为慢性期。

v-abl 质粒 由上海市肿瘤研究所顾建人教授馈赠菌株,本实验室分离纯化。该质粒中

含 2.8kb v-abl 的 HincII-HindIII 片段^[6]。

限制性内切酶、蛋白酶 K 和 λ DNA-Hind III 分子量标准 购自北京协和医大友谊公司或华美生物工程公司。

α -³²P-dCTP 北京福瑞公司产品。比放约 3000Ci/mmoL。

酚 分析纯试剂,经重蒸馏后用 0.5mol/L, pH8.0 Tris 缓冲液饱和。

氯仿 分析纯试剂,每 24 份氯仿加 1 份异丙醇。

二、方法

1. 白细胞 DNA 的提取 取全血 5—10 ml,用 10 倍体积 0.15mol/L NH₄Cl 裂解红细胞,离心收集白细胞并用 0.15mol/L NaCl 洗涤两次。将白细胞悬于 0.15mol/L NaCl 中,作细胞计数。取 4×10^7 细胞,冻溶于 10ml 的 0.1mol/L, pH 8.0 Tris, 20 mmol/L EDTA, 1% SDS, 200 μ g/ml 蛋白酶 K 中,50 $^{\circ}$ C 保温 8 小时;然后用酚/氯仿(1:1)抽提去蛋白,冰乙醇沉淀 DNA。将 DNA 沉淀转移至另一离心管内,真空抽干后溶于 $1 \times TE$ 中,用溴乙锭荧光

* 本工作由国家科技攻关项目基金资助。

** 华西医科大学附一院内科血液病室。

法确定其浓度。

2. 探针的标记 取 $1\mu\text{g}$ v-abl 探针 DNA 及 $100\mu\text{Ci}$ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$, 按常规缺口翻译法^[7]标记。比活性为 $1 \times 10^8\text{cpm}/\mu\text{g}$ DNA。

3. Southern 印迹杂交 取 $20\mu\text{g}$ DNA, 在标准条件下用限制性内切酶消化, 然后在 TBE 电泳缓冲液中, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离, 变性、中和后转移至硝酸纤维膜上, 80°C 烘烤 2 小时^[7]。预杂交及杂交均按常规方法进行^[7]。在 68°C 杂交 16 小时后, 将滤膜置 $0.1 \times \text{SSC}$, 0.5% SDS 中于 68°C 漂洗 1 小时, 晾干后夹于 X 光片中, 于 -70°C 曝光 7 天。

结 果

用 v-abl 探针与 7 例慢粒白血病细胞 DNA 和 1 例正常人白细胞 DNA 的 PvuII 酶切片段杂交, 所得结果(图 1)表明, 有 4 例慢粒白血病的杂交图谱(样品 2—5)与正常人(样品 1)相同, 即 v-abl 同源的酶切片段共有 7 条, 其大小分别为 10.0kb、7.8kb、6.6kb、5.6kb、4.8kb、3.8kb 和 2.3kb。另外 3 例慢粒白血病的杂交图谱(样品 6—8)则与此不同, 其 10.0kb、7.8kb、6.6kb 和 4.8kb 的酶切片段消失, 新增加了一条 2.6kb 的酶切片段, 而且 2.3kb 的酶切片段量有明显增加。说明在这 3 例慢粒白血病细

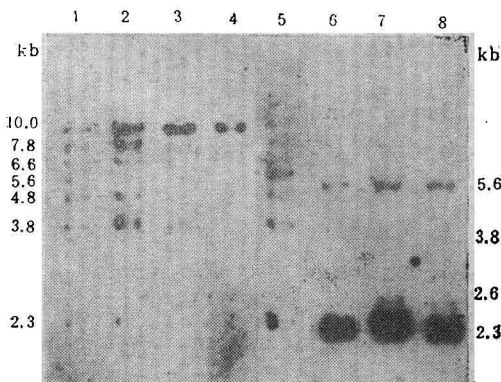


图 1 Pvu II 消化 DNA 样品的 Southern 印迹杂交分析

Fig. 1 Southern blot hybridization assay of DNA samples digested by PvuII

1. normal human 2—8. chronic myeloid leukemia

胞中, Ph 染色体重排累及了 c-abl 癌基因内部, 并导致了多处 Pvu II 酶切位点的改变。

在 Hind III 酶切片段的杂交图谱(图 2)上, 上述 3 例慢粒白血病的酶谱(样品 6—8)亦有改变, 即除了存在共同的 20kb 和 15kb 的酶切片段外, 还新增加了一条 2.5kb 的酶切片段。说明重排亦累及了 Hind III 酶切位点。

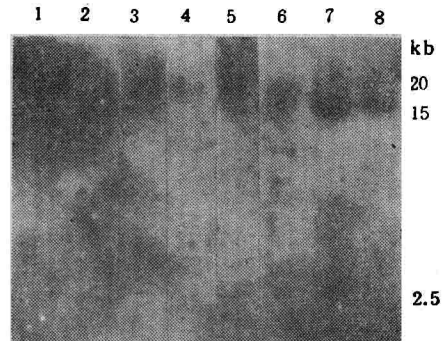


图 2 Hind III 消化 DNA 样品的 Southern 印迹杂交分析

Fig. 2 Southern blot hybridization assay of DNA samples digested by HindIII

1. normal human 2—8. chronic myeloid leukemia

与此不同, 在 Bgl II 酶切片段的杂交图谱(图 3)上, 所有慢粒白血病和正常人均有 7.6 kb 和 4.8 kb 的两条酶切片段。这一结果说明, 重排可能未累及 Bgl II 酶切位点; 也可能是由于所得酶切片段太大或太小, 而不能获得相应杂交图谱所致。

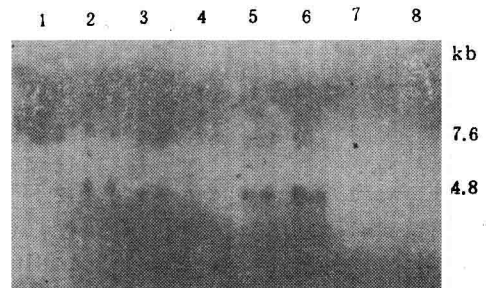


图 3 Bgl II 消化 DNA 样品的 Southern 印迹杂交分析

Fig. 3 Southern blot hybridization assay of DNA samples digested by Bgl II

1. normal human 2—8. chronic myeloid leukemia

讨 论

Heisterkamp 等的研究表明,当 Ph 染色体重排时,22 号染色体上的断裂点分布在一 5.8 kb 的区段内,这一 DNA 片段被称为“bcr”。但他们对其中 3 例慢粒白血病断裂点周围 DNA 顺序的分析,没有发现 DNA 的断裂与特定的核苷酸顺序相关^[8]。与此不同,9 号染色体上断裂点的分布则较弥散,近者仅距 c-abl 癌基因第一外显子约 14kb,远者可达 80 kb 以上^[2]。

由于我们所使用的 v-abl 癌基因探针^[6]几乎能与人 c-abl 癌基因的全部编码外显子退火,因而可以通过限制酶谱分析,检测出断裂点位于 c-abl 癌基因附近或内部的重排。在我们的结果中,有 4 例慢粒病例(样品 2—5)的 Pvu II、Hind III 和 Bgl II 酶谱均与正常人相同,因而推测在这些病例中,重排断裂点距 c-abl 癌基因较远,至少 >15kb。这些结果与 Heister-kamp 等的报道^[2]相似。

与此不同,另外 3 例慢粒病例(样品 6—8)的 Pvu II 和 Hind III 酶切图谱与正常人和上述 4 例慢粒病例有明显差别,特别是存在多处 Pvu II 酶切位点的改变。因而推测在这些病例

中,重排断裂点位于 c-abl 癌基因附近或内部,并且可能有多次多点重排发生。至于这些限制图谱的改变是否与基因点突变有关,还有待实验证明。

综上所述,我们似乎可以将慢粒白血病中 c-abl 癌基因的重排分为两类。一类的重排断裂点离 c-abl 癌基因较远,因而对其酶谱影响不大;另一类的重排断裂点离 c-abl 癌基因较近,或位于该基因内部,并可能有多次多点重排发生,因而其酶谱有明显改变。在一些慢粒白血病中,可以发现存在累及 9 号和 22 号以外染色体的变异型 Ph 染色体重排,这些病例可能就是属于后一类。

参 考 文 献

1. Nowell PC *et al. Science*, 1960; 132: 1497
2. Heisterkamp N *et al. Nature*, 1983; 306: 239
3. Groffen J *et al. J Exp Med*, 1983; 158: 9
4. Groffen J *et al. Cell*, 1984; 36: 93
5. Konopka JB *et al. Cell*, 1984; 37: 1037
6. Premkumar RE *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80: 3623
7. Maniatis T *et al. Molecular cloning*. New York: Cold Spring Harbor Lab, 1982: 109, 150, 383, 387
8. Heisterkamp N *et al. Nature*, 1985; 315: 758

[本文于1988年11月7日收到]

REARRANGEMENT OF c-abl ONCOGENE IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Li Hong Wu Jinxu Sun Zhilin

(Dept. of Biochemistry, Dept. of Internal Medicine of the First Affiliated Hospital, WUCMS)

ABSTRACT

The authors analyzed the PvuII, HindIII and BglIII restriction enzyme mappings of seven cases of chronic myeloid leukemia, using a v-abl probe labeled by α -³²P-dCTP. The results showed that the PvuII and HindIII mappings of three cases among the seven had been remarkably altered and the multiple changes of PvuII sites had been observed, as compared with the normal subject. Therefore, the authors predicted that Ph chromosomal rearrangement in this kind of chronic myeloid leukemia could involve the inside of c-abl oncogene and might be a multiple rearrangement as well.

Key words chronic myeloid leukemia, c-abl oncogene, gene rearrangement, v-abl probe, Southern blot hybridization