

# 中国儿童急性淋巴细胞性白血病染色体 6q16.3~21 区域候选肿瘤抑制基因的 定位与鉴定 \*

康 睿<sup>1)</sup> 曹励之<sup>1)\*\*</sup> 俞 燕<sup>1)</sup> 杨明华<sup>1)</sup> 张朝霞<sup>1)</sup> 郭碧贇<sup>1)</sup>  
谢 岷<sup>1)</sup> 陈 英<sup>1)</sup> 谭志红<sup>1)</sup> 王 卓<sup>1)</sup> 胡 婷<sup>1)</sup> 吴秀山<sup>2)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>中南大学湘雅医院儿科, 长沙 410008; <sup>2)</sup>湖南师范大学生命科学院, 长沙 410081)

**摘要** 为了克隆儿童急性淋巴细胞性白血病 (ALL) 候选肿瘤抑制基因, 首先选取分布于 6q16.3~21 上的 11 个多态性微卫星标记, 对 139 例中国儿童 ALL 标本进行杂合性缺失 (LOH) 分析. 分析显示 32% 的患者存在至少一个位点的 LOH, 且高频缺失区位于 D6S1709~D6S301 之间, 大小为 2cM. 各位点 LOH 与白细胞总数、病态细胞数有显著性相关 ( $P < 0.05$ ), 与年龄、性别、形态学分型和免疫学分型无显著相关 ( $P > 0.05$ ). 进一步在高频缺失区域内, 采用定位候选克隆策略、生物信息学技术及 RT-PCR 技术筛选、鉴定与儿童 ALL 相关的候选肿瘤抑制基因及其 cDNA 片段. 在 D6S1709~D6S301 之间筛选到一个在儿童 ALL 细胞中低表达的 EST (GenBank 登录号: AA403058), 与正常外周血单个核细胞比较, 在 15 例 ALL 患者中有 10 例表达下调 ( $P < 0.05$ ). 采用数字化差异表达分析显示, 位于 6q16.3~21 区域内的 AMD1 基因、PPIL6 基因和 WASF1 基因在肿瘤组织中的表达丰度要低于正常组织 ( $P < 0.05$ ). 上述结果为进一步在 6q16.3~21 区域克隆肿瘤抑制基因提供了线索.

**关键词** 儿童急性淋巴细胞性白血病, 6q16.3~21, 肿瘤抑制基因, 杂合性缺失, 表达序列标签 (EST), 数字化差异表达分析  
**学科分类号** R725.5

白血病是我国儿童和青少年最常见的恶性肿瘤疾病, 其中又以急性淋巴细胞性白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 最为多见, 占儿童白血病 70% 左右. 同许多其他肿瘤一样, ALL 的发病也是一个多基因多阶段作用的结果, 涉及多种癌基因、肿瘤抑制基因的改变, 如癌基因 RAS、MYC、HOX11、TAL1, 肿瘤抑制基因 p53 和 GRIK2 等. 目前这种疾病的确切分子机制仍不清楚.

近年来, 儿童 ALL 肿瘤抑制基因功能丧失日益受到学术界的普遍关注<sup>[1]</sup>. 确定儿童 ALL 常见丢失或失活的肿瘤抑制基因, 将其定位、分离, 并研究其生物学功能已成为儿童白血病研究中十分活跃的领域之一. 利用微卫星标记位点 (microsatellite marker) 进行肿瘤细胞染色体杂合性缺失 (loss of heterozygosity, LOH) 分析, 已成为目前检测肿瘤抑制基因失活和发现及定位新的肿瘤抑制基因的重

要手段之一. 文献报道儿童 ALL 存在下列杂合性缺失位点: 6q、7p、9p、11q、12p、17q 等, 其中染色体 6q 是频繁丢失的“热点”区域<sup>[2~6]</sup>. 进一步缩小儿童白血病 LOH 的高频缺失区域对于克隆和分离候选肿瘤抑制基因具有重要意义.

本研究选取分布于 6q16.3~21 上的 11 个多态性微卫星标记, 对 139 例中国儿童 ALL 标本进行 LOH 分析, 以明确 LOH 发生的高频缺失区域. 进一步在高频缺失区域内, 采用定位候选克隆策略、生物信息学技术及 RT-PCR 等技术, 筛选、鉴定与儿童 ALL 相关的候选肿瘤抑制基因及其 cDNA 片段.

\*国家自然科学基金资助项目 (30571982, 30270722).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 0731-4327208, E-mail: caolizhi318@hotmail.com

收稿日期: 2005-06-16, 接受日期: 2005-07-31

## 1 材料和方法

### 1.1 标本采集及单个核细胞的分离

本院门诊及住院的儿童初治 ALL 患者 139 例 (均根据临床表现、外周血涂片、骨髓细胞形态学、免疫学分型及骨髓活检等综合指标, 参照 FAB 诊断标准确诊), 正常健康儿童 30 例. 根据知情同意原则, 抽取患者及健康供者骨髓或外周血 5 ml, 肝素抗凝, 采用 Ficoll 密度梯度离心法分离单个核细胞<sup>[7]</sup>. 即在试管中加入适量淋巴细胞分离液 (上海华精公司), 取肝素抗凝骨髓或外周血与等量生理盐水充分混匀, 用滴管沿管壁缓慢叠加于分层液面上. 离心 2 000 r/min 20 min. 离心后管内分为三层, 上层主要为血浆, 下层主要为红细胞和粒细胞. 中层为淋巴细胞分离液, 在上、中层界面处有一以单个核细胞为主的白色云雾层狭窄带, 单个核细胞包括淋巴细胞和单核细胞. 用毛细吸管插到云雾层,

吸取单个核细胞, 置入另一试管中.

### 1.2 LOH 分析

用苯酚 - 氯仿抽提法提取单个核细胞基因组 DNA, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测总 DNA. 紫外分光光度计测量  $A_{260}/A_{280}$  比值. 选取位于 6q16.3~21 上的 11 个多态性微卫星标记合成引物进行 PCR 扩增 (表 1, 引物由上海博亚生物技术有限公司合成), 然后将扩增的产物进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳以及银染. 将所得的结果根据判定标准进行分析: a. 首先判断样本是否为信息个体 (informative cases): 信息个体标本扩增的产物经电泳、银染后出现两条带; b. 判断样本是否发生 LOH<sup>[3]</sup>: 与正常对照比较, 若某一个微卫星位点的等位基因条带消失或相对密度减少 50% 以上记为 LOH; c. 判断样本是否是微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MI): 若肿瘤细胞的条带与正常细胞相比出现等位基因条带的增多和大小的改变等记为 MI.

Table 1 Sequence and size of microsatellite loci

| Locus   | Chromosome arm | Sequence                                              | Tm/°C | Size/bp |
|---------|----------------|-------------------------------------------------------|-------|---------|
| D6S449  | 6q16.3~6q21    | TCAAAAAGGTTAAGTAACAGG<br>TCAATACAGTATGACAAACAATG      | 54    | 193~199 |
| D6S1709 | 6q16.3~6q21    | GCGACAGAATGCCATAGAAATTAC<br>ACTTGAAAAATTATTAGCCAATGC  | 54    | 134~160 |
| D6S283  | 6q16.3~6q21    | GGTTTTACAAAATCCTGTCCTGCTT<br>CTATAGTGCTGATTTCTCTCTCTC | 55    | 219     |
| D6S434  | 6q16.3~6q21    | CAGGTAGTCCCCAAAATCA<br>AGCTCAGGGCTTATGCCAGT           | 55    | 193~234 |
| D6S301  | 6q16.3~6q21    | CAGCCTCCACAATCATATGT<br>AATGTGCATACGCAAAAGTC          | 56    | 242     |
| D6S447  | 6q16.3~6q21    | GCTGAAATCATGCCACTGT<br>AGAAGGGTTCTGTGCAAGC            | 54    | 195~212 |
| RH35726 | 6q16.3~6q21    | CCGTGAAAAGACATGAAGGG<br>AGTTTTGCCTTTCCAGAAT           | 54    | 177~178 |
| D6S268  | 6q21~6q22      | CTAGGTGGCAGAGCAACATA<br>AAAAGGAGGTCATTTTAATCG         | 54    | 86~100  |
| D6S246  | 6q21~6q22      | GTCGCTTGAGTCTGGGAGGTCAAT<br>GGGTTTGAAAGAAGACTGCAGCCT  | 56    | 220     |
| D6S1594 | 6q21~6q22      | ATTGCTAACAGCCTGAGAC<br>AGCTTAAAGTGTAGGACGG            | 54.5  | 116~140 |
| D6S302  | 6q21~6q22      | TTCACAATGACAAGTCGAGG<br>TTCTTTAGGATAAGCCAATACACG      | 55    | 185~207 |

### 1.3 生物信息学分析

通过 UCSC (University of California, Santa Cruz) 基因组浏览器 (<http://genome.ucsc.edu/>) 查询 UCSC 数据库 (April, 2003) 儿童 ALL 高频缺失区域内的基因资料. 对查找到的所有表达序列标签 (expressed sequence tags, EST) 在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 下进行同源性比较、分析, 剔除代表已克隆基因的 EST. 然后将剩余的 EST 在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 下进行 EST 之间的同源性比较、分析, 剔除来源于同一族的 EST. 选择的标准是<sup>[9]</sup>: a. 与已知基因同源性约 50%~85%; b. EST 长度至少在 200 个碱基对以上; c. 代表未克隆基因; d. 有关于染色体定位信息的说明. 对 6q16.3~21 缺失区内的已知基因, 通过美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 的癌症基因组剖析计划 (CGAP) 中的在线工具 (<http://cgap.nci.nih.gov/>) 进行正常组织与肿瘤的数字差异表达分析 (又称虚拟 Northern).

### 1.4 RT-PCR 检测

用 TRIzol 试剂 (Gibco 公司) 抽提单个核细胞总 RNA, 并用 DNA 酶 I 消化除去总 RNA 中的痕量 DNA, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA. 紫外分光光度计测量  $A_{260}/A_{280}$  比值. 用鸟类成髓细胞瘤病毒 (avian myeloblastosis virus, AMV) 反转录酶 (Takara 公司) 合成第一链, 用 2  $\mu$ l 的反转录产物作为模板, 按如下的反应条件进行 PCR 扩增: 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环. 根据生物信息学分析筛选的代表潜在新基因的 EST 设计引物. 所需引物如下. 内对照 (GAPDH) 上游: 5' AAGCCCATCACCATCTTCCA 3', 下游: 5' CCTGCTTCACCACCTTCTTG 3'; 目标 EST 片段 AA403058 上游: 5' CATGGCACAATC-AGACTGAG 3', 下游: 5' CTGCAACGCCAAGT-ACATAG 3'; AI357622 上游: 5' TGGTTCTCA-TCTTAACATGTGG 3', 下游: 5' GCTGAGTGAT-CCTGGATAATG 3'; CA395317 上游: 5' CGCGT-CCTGTGTCAGTTGT 3', 下游: 5' ATCAACTGT-TGCGTGAGAGC 3'. 引物由上海博亚生物技术有限公司合成. PCR 产物点样于 1.5% 琼脂糖凝胶, EB 染色. 电泳结果拍照、扫描后经 Band Leader 软件分析灰度值.

### 1.5 统计学分析

应用 SPSS10.0 软件处理实验数据. 用  $\chi^2$  检验

分析 LOH 与临床指标的相关性;  $t$  检验进行两样本均数比较.  $P < 0.05$  认为有统计学意义.

## 2 结 果

### 2.1 微卫星位点等位基因的 LOH 分析结果

139 例 ALL 患者中, 共有 45 例 (32%) 存在一个或多个位点的 6q16.3~6q21 LOH, 23 例患者表现为不同程度的连续性 LOH, 其中位于 D6S1709~D6S301 位点之间的丢失频率均较高 (17%~22%), 为高频缺失区, 位于当中的 D6S283 位点丢失频率最高 (图 1, 图 2, 表 2). 图 1 所示为代表性的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果. 图 2 所示为微卫星位点 LOH 在 139 例病人中的发生频率. 通过 NCBI 网站查得在 GenethonMap 上 D6S1709 位于 109.20 cM 处, D6S301 位于 111.20 cM 处, 二者之间的遗传距离为 2 cM.

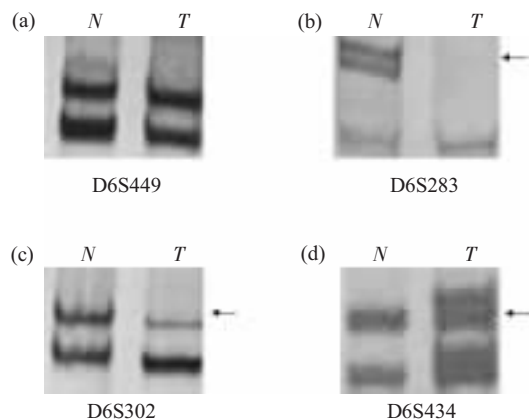


Fig. 1 Represent polyacrylamide gel map of allelic LOH

LOH analysis of Child No.4 at D6S449, D6S283, D6S302, D6S434 was showed. (a) Without LOH. (b) Arrowheads indicate the deletion one allele. (c) Arrowheads indicate the density of one allele reduced > 50%. (d) Arrowheads indicate the presence of microsatellite instability (MI). N: Normal DNA; T: Tumor DNA.

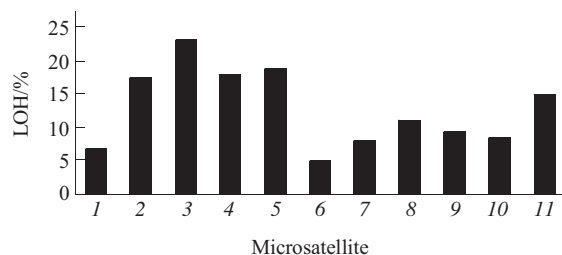


Fig. 2 Map of microsatellite LOH frequency

1: D6S449; 2: D6S1709; 3: D6S283; 4: D6S434; 5: D6S301; 6: D6S44; 7: RH34721; 8: D6S268; 9: D6S246; 10: D6S1594; 11: D6S302.

Table 2 LOH in primary ALL

| Chromosome arm | Locus   | Allelic loss/Informative cases |
|----------------|---------|--------------------------------|
| 6q16.3~6q21    | D6S449  | 9/136                          |
| 6q16.3~6q21    | D6S1709 | 22/129                         |
| 6q16.3~6q21    | D6S283  | 30/132                         |
| 6q16.3~6q21    | D6S434  | 24/137                         |
| 6q16.3~6q21    | D6S301  | 24/130                         |
| 6q16.3~6q21    | D6S44   | 6/128                          |
| 6q16.3~6q21    | RH34721 | 10/126                         |
| 6q21~22        | D6S268  | 14/131                         |
| 6q21~22        | D6S246  | 11/122                         |
| 6q21~22        | D6S1594 | 10/120                         |
| 6q21~22        | D6S302  | 19/129                         |

2.2 微卫星位点等位基因的 MI 分析结果

在所选位点中 MI 的发生例数仅 2 例, 为 1% (图 1), MI 的发生率明显低于 LOH 的发生率, 这说明 6q 上的 MI 不是儿童 ALL 的频发事件.

2.3 LOH 与临床指标相关性的统计结果

用  $\chi^2$  检验分析杂合性缺失与临床各项指标的关系, 结果显示, 白细胞总数和骨髓中病态细胞数的不同与 LOH 产生情况有显著差别, 其  $P < 0.05$ , 而性别、年龄因素、形态分型以及免疫分型则无显著差别 (表 3).

2.4 针对 EST 的序列相似性搜索结果

采用定位候选克隆策略, 查询 UCSC 数据库 (April, 2003), 结果显示, D6S1709~D6S301 高频缺失区域内存在 55 个 EST, 通过 BLAST 工具进行序列相似性搜索, 剔除 37 个代表已知基因的 EST, 筛选出 18 个可能代表潜在新基因的 EST. 表 4 列出了上述 18 个 EST 的 GenBank 登录号.

Table 3 The relation of LOH with clinic marker of ALL

| Clinical features at diagnosis | Total | No. with 6q16.3~21 LOH | No. without 6q16.3~21 LOH | P      |
|--------------------------------|-------|------------------------|---------------------------|--------|
| Sexual                         |       |                        |                           |        |
| Male                           | 86    | 25(29.1%)              | 61(70.9%)                 | 0.191  |
| Female                         | 53    | 20(37.7%)              | 33(62.3%)                 |        |
| Age (years)                    |       |                        |                           |        |
| 1~12                           | 108   | 35(32.4%)              | 73(67.6%)                 | 0.585  |
| ≤1 or ≥12                      | 31    | 10(32.3%)              | 21(67.7%)                 |        |
| WBC counts                     |       |                        |                           |        |
| <50×10 <sup>9</sup>            | 119   | 32(26.9%)              | 87(73.1%)                 | 0.001* |
| ≥50×10 <sup>9</sup>            | 20    | 13(65.0%)              | 7(35.0%)                  |        |
| Blast cells                    |       |                        |                           |        |
| <80%                           | 72    | 35(48.6%)              | 37(51.4%)                 | 0.000* |
| ≥80%                           | 67    | 10(14.9%)              | 57(85.1%)                 |        |
| FAB standard                   |       |                        |                           |        |
| L1                             | 107   | 35(32.7%)              | 72(67.3%)                 | 0.530  |
| L2                             | 32    | 10(31.3%)              | 22(68.8%)                 |        |
| Immunophenotype                |       |                        |                           |        |
| B-ALL                          | 123   | 42(34.1%)              | 81(65.9%)                 | 0.171  |
| T-ALL                          | 16    | 3 (18.8%)              | 13(81.3%)                 |        |

\*  $P < 0.05$ .

Table 4 18 EST of representation new gene located in the high frequency deletion region by BLAST assay

|          |          |          |          |          |          |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| AA911579 | BQ952283 | AF017693 | AA479978 | AW976023 | R50763   |
| AV721135 | CA395317 | AI357622 | AI370155 | AW339415 | AV715036 |
| BG927665 | AI004469 | BG926235 | N49504   | AA398235 | AA403058 |

2.5 RT-PCR 检测 EST 表达的结果

进一步从 18 个代表潜在新基因的 EST 中选取位于高频缺失区域前、中、后 3 个不同位置 EST (GenBank 登录号分别为 CA395317、AI357622 及 AA403058)设计相应引物, 在 15 例 ALL 儿童和 5 例正常儿童外周血单个核细胞中进行了表达分析. 结果显示 GenBank 登录号为 AA403058 的 EST 片段在 67%(10/15)儿童 ALL 单个核细胞中的表达降低 ( $P < 0.05$ ), 而各组间 GAPDH 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ). 图 3 为 EST AA403058 的差异表达分析结果.

2.6 针对已知基因的数字化差异表达分析结果

同时采用生物信息学技术对 6q16.3~21 区域的 68 个已知基因进行了基因在正常组织和肿瘤组织中的数字化差异表达分析, 结果显示 3 个基因 (AMD1 基因、PPIL6 基因和 WASF1 基因) 在肿瘤组织中的表达丰度要低于正常组织, 该结果分别受到来自 EST 数据库和 SAGE 数据库的支持,  $P$  值均小于 0.05 (图 4).

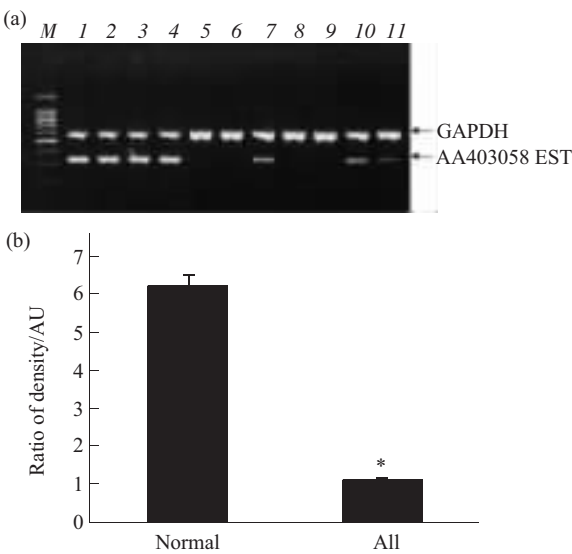


Fig. 3 Differential expression of AA403058 EST in normal and ALL peripheral blood mononuclear cell by RT-PCR assay

(a) A representative result from 11 people by RT-PCR assay. *M*: DNA marker; 1~4: Normal child; 5~11: ALL child; GAPDH: Internal control. (b) Statistic analysis for the differential expression. \*,  $P < 0.05$  as compared with normal group. ■: AA403058 EST.

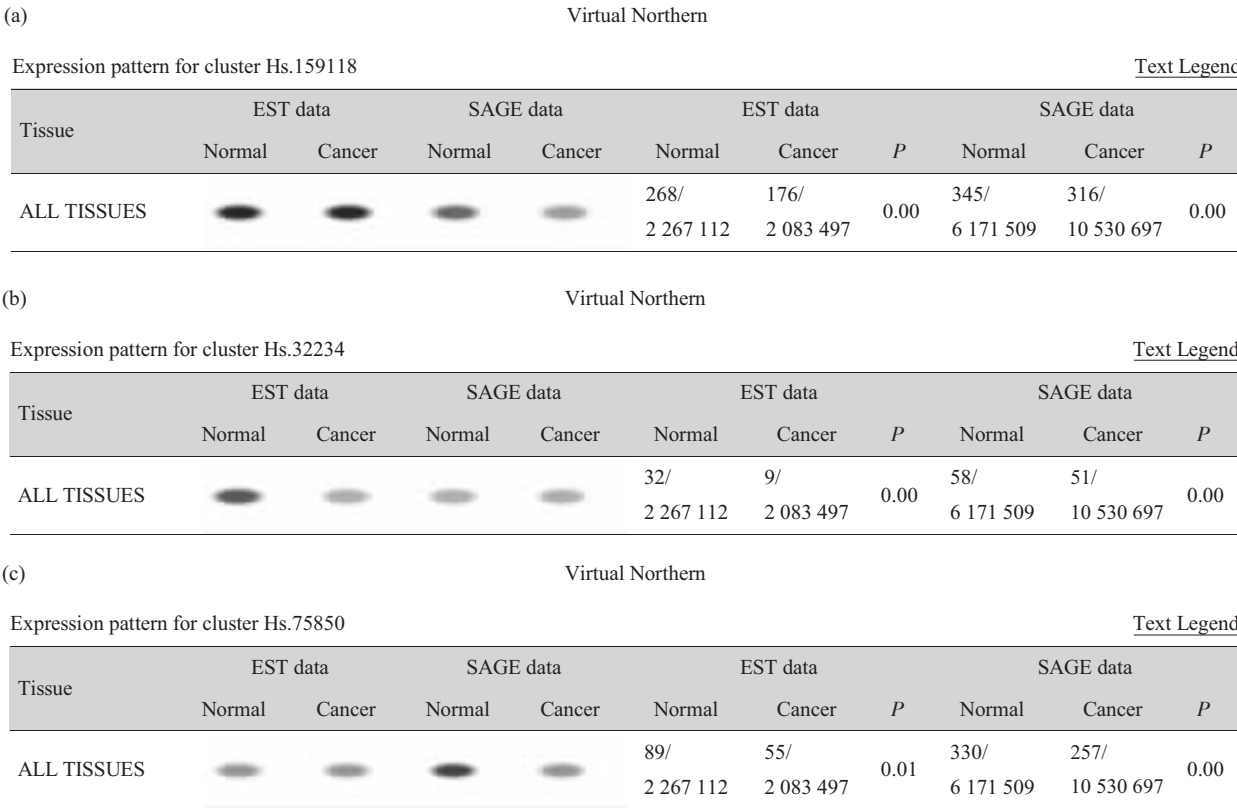


Fig. 4 The expression patterns of AMD1, PPIL6 and WASF1 in normal and cancer tissues by Virtual Northern assay (a) Hs.159118: AMD1; (b) Hs.32234: PPIL6; (c) Hs.75850: WASF1.  $P < 0.05$  was considered significant.

### 3 讨 论

病毒因素、物理因素、化学因素等外部因素均有致 ALL 作用, 遗传因素作为内在因素与 ALL 的发病也有着重要的关系, 其中细胞遗传学改变是一个很重要的环节, 它可以是先天遗传的改变, 也可以是病毒感染、电离辐射或化学物质诱发的体细胞突变. 现已明确, 染色体异常, 如缺失、易位、倒位和扩增等, 是儿童 ALL 发病过程中的一个关键步骤. 因此, 过去 10 年国内外主要关注的是识别 ALL 细胞中的染色体异常, 分离染色体异常累及的基因, 阐明它们致病的分子机制和与临床的关系.

染色体 LOH 是指肿瘤基因组中特定染色体上某种 DNA 多态标记的等位基因片段由正常组织基因组的两种变成一种, 即等位基因由杂合子变成纯合子. 检查肿瘤基因组中特定染色体上的多态标记, 通过 LOH 分析可准确定位肿瘤抑制基因, 并能发现新的肿瘤抑制基因座位.

在急性白血病及其他血液系统恶性肿瘤中, 6q 缺失较为常见, 且常表现为继发性染色体改变, 即多出现于肿瘤的迟发阶段或转移后和进展阶段, 6q 可能存在与肿瘤相关的肿瘤抑制基因. 国外研究发现 5%~20% 儿童 ALL 病人中检测到 6qLOH<sup>[23]</sup>. 本研究发现 32% 的中国儿童 ALL 病人发生 6qLOH, 表明染色体 6q 异常在儿童 ALL 发病中起到重要作用. 随着研究的深入, 国外在 ALL 与非何杰金淋巴瘤研究中又相继报道了一些 6q 的共同缺失区域: 6q12~21、6q14~21、6q15~6q22、6q12.1、6q21~22、6q21~23、6q23、6q23~24、6q23.1~27 和 6q25~27. 其中 Takeuchi 等<sup>[2]</sup>将儿童 ALL LOH 的频发区域定位于 D6S284 和 D6S276 两个标记之间 (6q15~6q22), 接着缩小到 D6S283~D6S302 和 D6S275~D6S283 之间的 9cM 和 8cM 的区域. Gerard 等<sup>[9]</sup>在儿童 ALL 的研究中, 将 LOH 的频发区域定位于 6q21~22 上一个 6cM 大小的区域. 随后, Jackson 等<sup>[10]</sup>进一步将儿童 ALL 常见 LOH 定位于 6q21~23 上一个约 3.5cM 大小的区域. 本研究通过分析 139 例中国儿童 ALL 等位基因 LOH 情况后, 在国内外首次发现了位于 6q16.3~21 上一个 2cM 大小的高频缺失部位, 即 D6S1709 和 D6S301 标记附近. 分析 LOH 的临床意义, 结果显示白细胞总数和骨髓中病态细胞数的不同与 LOH 产生情况有显著差别, 表明 LOH 的出现与肿瘤细胞的高负荷成正相关. 本研究缩小了儿童 ALL

LOH 频发区域, 为采用定位候选克隆策略分离此部位的肿瘤抑制基因提供了更加具体的部位.

克隆肿瘤致病基因的传统策略是定位克隆, 即通过染色体缺失或平衡易位以及连锁分析, 把这些基因定位于染色体上的特异区带, 采用染色体步移或跳步获取覆盖这一特定的 DNA 克隆群. 在此基础上运用外显子捕获法、杂交吸附筛选法、寻找 CpG 岛等方法获取候选基因的 cDNA 序列, 进一步检测候选基因在受累组织、细胞中改变情况. 这一方法目的性极强, 需要消耗大量精力用于文库筛选和序列测定, 基于这一缺陷, 本研究采用了定位候选克隆策略, 即一旦把某致病基因定位于染色体上某一区带, 就可以通过计算机搜寻所有定位于这一区域的已知基因、EST、cDNA 片段作为该致病基因的候选基因, 检测这些基因在受累组织、细胞中的改变情况就可以很快地找到致病基因.

采用定位候选克隆策略, 本研究通过查询 UCSC 数据库(April, 2003) 6q16.3~21 之间的基因资料, 结果显示在这个区间总计有 68 个已知基因 (来源于 SWISS-PROT, TrEMBL, mRNA 和 RefSeq). 采用虚拟 Northern 对定位该区域的已知基因进行了基因在正常组织和肿瘤组织中的数字化差异表达分析. 该方法是近年兴起的基因表达研究强有力的工具和方法, 已成为与基因表达系列分析 (SAGE)、基因芯片等并驾齐驱的高通量表达分析方法之一<sup>[11]</sup>. 结果显示: AMD1 基因、PPIL6 基因和 WASF1 基因在肿瘤组织中的表达丰度要低于正常组织, 该结果分别受到来自 EST 数据和 SAGE 数据的支持, *P* 值均小于 0.05. 上述这些基因都可能是儿童 ALL 候选肿瘤抑制基因, 结合该基因现有生物功能, 可做进一步的突变筛选检测研究. 另一方面, 针对 D6S1709~D6S301 高频缺失区域内已知的 55 个 EST, 本项目组通过 BLAST 工具进行序列相似性搜索, 剔除 37 个代表已知基因的 EST, 筛选出 18 个可能代表新基因的 EST, 并结合 EST 在人类基因组图谱的定位, 进一步从中选取位于高频缺失区域前、中、后 3 个不同位置 EST 设计相应引物, 在 ALL 和正常儿童外周血中进行了表达分析. 结果显示: GenBank 登录号为 AA403058 的 EST 在 67% 儿童 ALL 细胞中不表达或者表达下调, 表明该 EST 很可能编码一个潜在新的儿童 ALL 候选肿瘤抑制基因. 一旦差异表达的 EST 获得, 可以进一步采用电子克隆和其他技术进行拼接、延伸, 获得 cDNA 全长, 以期克隆出一

个新的候选肿瘤抑制基因. 以上工作进一步提示 6q16.3~21 上可能存在有一个或几个肿瘤抑制基因. 目前我们正在进行 AMD1 基因、PPIL6 基因和 WASF1 基因的突变筛选检测及其基于 EST 新基因的电子克隆.

### 参 考 文 献

- 1 Sinclair P B, Sorour A, Martineau M, *et al.* A fluorescence in situ hybridization map of 6q deletions in acute lymphocytic leukemia: identification and analysis of a candidate tumor suppressor gene. *Cancer Res*, 2004, **64** (12): 4089~4098
- 2 Takeuchi S, Seriu T, van Dongen J J, *et al.* Allelotype analysis in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*, 2003, **22** (44): 6970~6976
- 3 Takeuchi S, Koike M, Seriu T, *et al.* Frequent loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 6: identification of two distinct regions of deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*, 1998, **58** (12): 2618~2623
- 4 Baccichet A, Qualman S K, Sinnett D. Allelic loss in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 1997, **21** (9): 817~823
- 5 Takeuchi S, Tsukasaki K, Bartram C R, *et al.* Long-term study of the clinical significance of loss of heterozygosity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2003, **17** (1): 149~154
- 6 Scholz I, Popp S, Granzow M, *et al.* Comparative genomic hybridization in childhood acute lymphoblastic leukemia: correlation with interphase cytogenetics and loss of heterozygosity analysis. *Cancer Genet Cytogenet*, 2001, **124** (2): 89~97
- 7 任 昊, 侯凡凡, 张 训. 肝素对血液透析病人单核细胞表面晚期糖基化终产物受体的影响. *中华内科杂志*, 2002, **41** (1): 43~46
- 8 田 芳, 李友军, 陈主初, 等. 染色体 3p14.2 区域一个与鼻咽癌呈负相关 EST 的鉴定. *癌症*, 2000, **19** (2): 101~103
- 9 Gerard B, Cave H, Guidal C, *et al.* Delineation of a 6 cM commonly deleted region in childhood acute lymphoblastic leukemia on the 6q chromosomal arm. *Leukemia*, 1997, **11** (2): 228~232
- 10 Jackson A, Carrara P, Duke V, *et al.* Deletion of 6q16-q21 in human lymphoid malignancies: a mapping and deletion analysis. *Cancer Res*, 2000, **60** (11): 2775~2779
- 11 De Young M P, Damania H, Scheurle D, *et al.* Bioinformatics-based discovery of a novel factor with apparent specificity to colon cancer. *In Vivo*, 2002, **16** (4): 239~248

## Identification of Candidate Tumor Suppressor Genes in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia at Chromosome 6q16.3~21 in China\*

KANG Rui<sup>1)</sup>, CAO Li-Zhi<sup>1)\*\*</sup>, YU-Yan<sup>1)</sup>, YANG Ming-Hua<sup>1)</sup>, ZHANG Zhao-Xia<sup>1)</sup>, GUO Bi-Yun<sup>1)</sup>,  
XIE Min<sup>1)</sup>, CHEN Ying<sup>1)</sup>, TAN Zhi-Hong<sup>1)</sup>, WANG Zhuo<sup>1)</sup>, HU Ting<sup>1)</sup>, Wu Xiu-Shan<sup>2)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

<sup>2)</sup>Department of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

**Abstract** In order to identify candidate tumor suppressor genes (TSGs) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL), firstly, loss of heterozygosity (LOH) of 6q16.3~21 in 139 primary ALL samples was analyzed by using polymerase chain reaction (PCR) and 11 microsatellite markers. The frequency of LOH on 6q16.3~21 was 32%. A 2-cM high frequency deletion region was flanked by D6S1709 and D6S301 loci at 6q16.3~21. Clinical data showed that patient with 6q16.3~21 LOH had higher WBC counts and blast cells ( $P < 0.05$ ). The statistics about age, sex, classification of morphology and immunology were indistinct ( $P > 0.05$ ). Then, positional cloning strategy, bioinformatics technology and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to identify candidate TSGs and its cDNA fragments at 6q16.3~21, especially at the high frequency deletion region. Comparing with expression of normal peripheral blood mononuclear cell, EST screened in D6S1709-D6S301 (GenBank Accession No.AA403058) was down-regulation in ten of fifteen childhood ALL ( $P < 0.05$ ). Digital differential display showed that the expression levels of AMD1, PPIL6 and WASF1 were lower in cancer tissues than in normal tissues ( $P < 0.05$ ). These findings may provide new clues in cloning of childhood ALL TSGs at 6q16.3~21.

**Key words** childhood acute lymphoblastic leukemia, 6q16.3~21, tumor suppressor genes, loss of heterozygosity, expressed sequence tags, digital differential display

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30571982 and 30270722).

\*\*Corresponding author . Tel: 86-731-4327208, E-mail: caolizhi318@hotmail.com

Received: June 16, 2005 Accepted: July 31, 2005