

骨髓增生异常综合征(MDS)基因诊断研究

冯宝章 郝建萍 雷健玲 邵宗鸿

摘要 目的 根据 Southern 印迹杂交结果设计并合成适当引物。**方法** 以 32 例 MDS、13 例可疑 MDS、53 例其他血液病和 8 例正常人骨髓细胞 DNA 为模板进行 PCR。根据 PCR 结果和用于上述 Southern 印迹杂交的限制性酶切位点,设计并合成 2 个寡核苷酸(Oligos)经地高辛标记,对 33 例 MDS(包括转白血病者),3 例可疑 MDS 和 19 例其他血液病患者骨髓细胞涂片作原位杂交(ISH)。**结果** MDS 有共同的 PCR 产物电泳带型。MDS 原位杂交均呈阳性反应。对照组 19 例中仅有 1 例 AA 阳性反应,可疑 MDS 3 例中有 2 例阳性反应,且杂交信号的增强与 MDS 转白血病病相关($P < 0.01$),也与 SCD 阴性相关($P < 0.01$)。**结论** 建立起 MDS PCR 基因诊断法,笔者设计的两条 Oligos 所包含的限制性酶切位点的确是 MDS C-erbB 重排位置和重排/扩增位置,为 MDS 基因治疗提供了靶基因的靶位置。

关键词 MDS V-erbB PCR Oligos 原位杂交 基因诊断

[中图分类号] R446 [文献标识码] A

Gene Diagnosis for Myelodysplastic Syndromes (MDS). Feng Baozhang, Hao Jianping, Lei Jianling, Shao Zonghong. 1, V-erb Lab., V-erb(Tianjin) Gene Therapy Co. LTD, Tianjin 300020, China

Abstract Objective Based on Southern blot results, we designed and synthesized a pair of primer and two oligodeoxynucleotides (Oligos) for MDS gene diagnosis. **Methods** The PCR test on bone marrow cell's DNA for 32 cases patients with MDS, 13 cases with suspicious MDS, 53 cases with other hematologic diseases and 8 normal donors. Two Oligos were designed and synthesized and then marked with digoxin. In-situ hybridization (ISH), bone marrow cell smear was performed for 33 cases patients with MDS (including MDS transformed-leukemia), 3 cases suspicious MDS and 19 cases other hematologic diseases. **Results** The results showed that all MDS cases have a common PCR electrophoretic band type. All MDS yielded positive reaction in ISH. In control group of 19 cases, however, there was only 1 case AA, 2 out of 3 cases suspicious MDS showed positive reaction. The signal enhancement of ISH is related not only to MDS transformation into leukemia ($P < 0.01$), but also to SCD negative reaction ($P < 0.01$). **Conclusion** This produces a MDS PCR gene diagnosis method. This proves that the restriction site within two Oligos we designed is indeed at the position of MDS C-erbB rearrangement and rearrangement/amplification. Hence, a target position for MDS gene therapy is found.

Key words MDS; V-erbB; PCR; Oligos; In-situ hybridization (ISH); Gene diagnosis

众所周知,骨髓增生异常综合征(MDS)又称白血病前期,有 5 个亚型。其中难治性贫血(RA)是它们的基本型,可以转化为原始细胞增多的 RA(RAEB)和转化中的 RAEB(RAEBT),以及急性白血病(AL)。MDS 诊断的难点在于 RA 以及同其他已知贫血出血病的鉴别诊断。笔者曾以 V-erbB 和 V-erbB + A 为探针 Southern 印迹杂交法对 MDS 进行基因诊断研究,并获得满意的结果^[1]。在此基础上,笔者设计并合成两对引物,以 MDS、再生障碍性贫血(AA)和原发性血小板减少性紫癜(ITP)等患者骨髓细胞 DNA 为模板进行 PCR 基因诊断研究,发现其中一对引物适用于约 90% 的 MDS-RA 和可疑 RA 的

基因诊断以及同其他已知贫血出血病的鉴别诊断。现将结果报道如下。

材料与方法

1. 病例:MDS-RA 19 例,可疑 RA 13 例,RAEB(T) 13 例;AA 17 例,可疑 AA 4 例;ITP 15 例;溶血性贫血(HA) 2 例;红血病,PNH, α -地中海贫血和巨幼细胞性贫血(MA)各 1 例;AL 和恶性肿瘤 8 例;慢粒和真性红细胞增多症(PV) 3 例,共 98 例。正常人 8 人。32 例 MDS 中男性 24 例,女性 8 例。患者年龄 16~69 岁,平均年龄 44 岁。可疑 RA 指 RA/AA, RA/HA 或 RA/ITP。而可疑 AA 指 AA/RA。细胞遗传学研究支持可疑 RA 为早 RA,而可疑 AA 为早 AA^[2]。此类病例随访结果证实了这一点。上述病例均由笔者医院血液内科诊断,其中大多数为住院患者。

2. 方法:(1)PCR 方法:①骨髓细胞模板 DNA 的提取:用小刀将患者骨髓涂片上的细胞刮下来,收集于 1.5ml EP 管内,加入 TEN (15mmol/L Tris, 15mmol/L EDTA, 15mmol/L NaCl, pH8.0)液 500 μ l, 10% SDS 75 μ l,蛋白酶 K (2.0mg/ml)

作者单位:300020 天津市韦尔柏基因治疗公司韦尔柏实验室(冯宝章、郝建萍、雷健玲);中国医学科学院/北京协和医学院血液病医院(邵宗鸿)

10 μ l, 于 55℃ 水浴中孵育 5h, 其余步骤与文献[1] 相同; ②聚合酶链反应(PCR) 条件: 模板变性条件为 97℃ 7min, 32 个循环, 每个循环中变性条件为 94℃ 5min, 退火条件为 52℃ 1min, 延伸条件为 72℃ 2min, 最后一次循环之后延伸时间为 5min, 取出置于 4℃ 保存; ③PCR 产物的检测: 1.8% 琼脂糖凝胶电泳, 每孔点样品(PCR 产物) 10 μ l, 60V, 30mA, 电泳 20 ~ 25min, EB 染色, 紫外线灯下观察结果。(2) 原位杂交(ISH) 方法(采用宝灵曼公司 DIG - 标记及检测试剂盒): ①骨髓穿刺标本 4ml 于肝素管中抗凝, 经淋巴细胞悬液离心收集于 EP 管中, -20℃ 保全, 以备提取 DNA 用; ②V - erbB Oligo 探针标记: 杂交前细胞涂片的预处理, 予杂交和杂交, 杂交后的洗涤和检测等均按试剂盒的要求进行; ③结果观察: 显微镜下计数 200 个有核细胞。细胞核内出现棕褐色斑点为阳性反应。若阳性反应小于细胞核面积的 1/4 时计为“+”; 阳性反应大于细胞核面积的 1/4 而小于或等于细胞核面积的 2/4 时计为“++”; 小于或等于细胞核面积的 3/4 时, 计为“+++”; 阳性反应大于细胞核面积的 3/4 时, 计为“++++”。对上述病例作 V - erbB PCR 和 ISH 检测的同时, 每例均作骨髓细胞遗传学(包括核型分析和 SCD 检测) 检查, 其方法见参考文献[2]。

结 果

1. PCR 检测结果: 对 32 例 MDS 和 12 例可疑 MDS 作 PCR 检测结果如下: ①RA 和可疑 RA 有其特殊的 PCR 产物电泳带型即 4 条大小不同的条纹(图 1); ②典型 AA 和 ITP 均无带纹; ③可疑 AA 有 1 ~ 2 条带, 与早期红血病相似; ④少数 ITP 和 HA 有 1 ~ 2 条带纹; ⑤正常人和 MA 无带。其他贫血病和出血病均无此带型。表明其高度的特异性, 详见表 1。

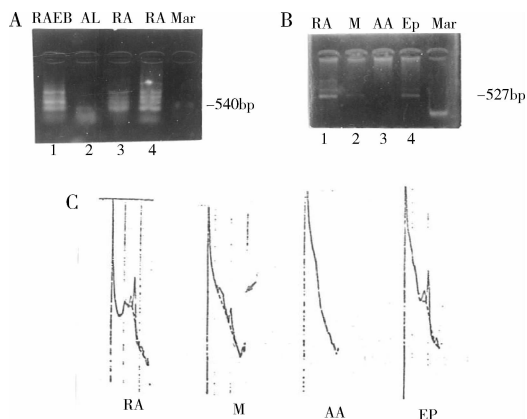


图 1 患者骨髓 V - erbB PCR 检测结果

A. MDS - RA 和 RAEB(泳道 1, 3, 4) PCR 带型(4 条带); AL(泳道 2) 仅 1 条带, 它与 MDS 4 条带中最小的 1 条带相同; B. 显示 1 例 MDS 4 条带(泳道 1) 和她的母亲(M) (泳道 2) 仅 1 条小的带; 1 例红血病(EP) (泳道 4) 两条带, 与 MDS 4 条带中最小的两条带相同, 她的女儿(泳道 3) 为 1 例 AA 患者则无带; C. 为图 1B 光扫描图; AA 无峰, M1 个峰, EP 两个峰, 而 RA 则 4 个峰, 与电泳图相同

表 1 44 例 MDS 和可疑 MDS 患者骨髓检查结果

诊断	n	SCD		核型		PCR		PCR 阳性率(%)
		(+)	(-)	正常	异常	(+)	(-)	
RA	20	13	5	8	12*	14	6	70.0
RAEB(T)	12	2	9**	6	4**	10	2	83.3
可疑 RA	12	7	5	6	6	11	1	91.6

*. 含 4 例 +8 而 PCR 均阴性者, 扣除此 4 例, 其 PCR 阳性率应为 87.5%; **. 少数病例未做 SCD 或核型分析

2. 原位杂交检查结果: 对 37 例 MDS(包括转白血病者), 3 例可疑 MDS 和 19 例对照组(包括 8 例 ITP, 7 例 AA, 3 例 IDA 和 1 例 α - 地中海贫血) 原位杂交检测结果如下: 全部 MDS 和 2 例(2/3) 可疑 MDS 呈阳性反应(图 2), 对照组仅 1 例 AA 有阳性反应。对其中 22 例 MDS 和 3 例可疑 MDS 同时进行 PCR 和原位杂交检测, 结果 17 例 MDS, 2 例可疑 MDS 为两项指标均阳性的病例, 阳性率 76%, 表明两者高度的一致性。

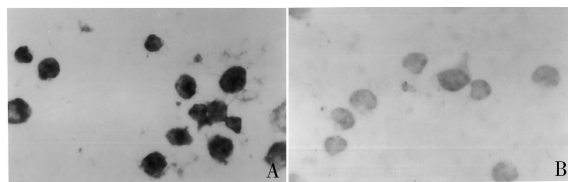


图 2 患者骨髓细胞 V - erbB Oligos 原位杂交(ISH) 照片
A 和 B 分别显示 MDS 阳性和 ITP 阴性反应

3. 动态观察: 对上述 7 例 MDS 先后进行两次以上随访检测并做动态观察, 同时对 MDS 各期的原位杂交积分值作 *t* 检验, 发现杂交信号积分值依次为: RA 组 < RAEB(T) 组 < 转白血病组($P < 0.001$ 和 0.005)。SCD 阳性组 < SCD 阴性组($P < 0.001$), 而核型正常组与异常组无统计学差异。说明随着 MDS 转为白血病, 其原位杂交积分值呈显著性增加。这一点亦同原位杂交积分值与 MDS 患者骨髓原始和早幼粒细胞百分率的增加($P < 0.001$), 和骨髓细胞 SCD 转阴的结果相一致。表明原位杂交结果不仅有诊断意义还有白血病发病学意义。

讨 论

如上所述, 应用现有这对引物 PCR, 约 75% MDS 呈阳性反应。扣除 +8 病例, 其阳性率高达 87.5% ~ 91.6%。说明这对引物适用于大多数 MDS 基因诊断。尽管 MDS 与早期红血病和良性代偿性增生骨髓有相同 PCR 产物电泳带纹(1 ~ 2 条带), 但后者均未见 MDS - RA 带型(4 条带), 其临床意义十分明显。至于 +8 MDS PCR 阴性的原因值得研究。国际

上曾有 2 名作者应用 V - erbB 探针作 Southern 印迹杂交,先后对 3 例 t(1;7)MDS 进行分析,其中 1 人曾获得阳性结果(仅见 C - erbB 扩增,不见重排);另 1 人未能取得阳性结果,因而无从建立 PCR 基因诊断法^[3]。

本文 1 例可疑 RA 骨髓细胞核型 46XX,病理检查支持 RA 诊断。其 V - erbB PCR 结果显示 RA 带型(图 1)从而确认其 RA 诊断。患者经两年余服用康力龙等雄性激素后骨髓象血象恢复正常至今已 5 年。在同一批 PCR 实验中,对其治疗前后骨髓细胞 DNA 进行检测,结果治疗后其 RA 带型消失。这一结果为其病情恢复正常提供了有力证据。笔者曾发现 1 例 RA 经相同的治疗后恢复正常。其原有的 C - erbB 重排/扩增消失。说明 RA 和早 RA 激素逆转正常是完全可能的^[4]。而笔者所建立的 V - erbB PCR 基因诊断法则为此提供了简便易行的检测手段。

针对上述两条有诊断和发病学意义的 Oligos,笔者设计并合成两条反基因 Oligos,经磷酸硫代修饰后,尾静脉注射对 16 只大鼠 MDS(其中 15 只为

RAEB)进行基因治疗研究。注射后 2 ~ 3 个月内 15 只病鼠骨髓象恢复正常,血象亦基本正常^[5,6]。这一结果有力地说明,上述正义 Oligos 经地高辛标记作骨髓细胞原位杂交结果确有诊断和发病学意义。

参考文献

- 冯宝章,雷健玲,王海青,等.骨髓增生异常综合征(MDS)基因诊断和发病原理研究[J].中华肿瘤杂志,1995,17(增刊):159
- 冯宝章,雷健玲,刘焕勋,等.骨髓增生异常综合征(MDS)和再生障碍性贫血(AA)等细胞遗传学研究[J].中华内科杂志,1994,33:754
- Woloschak GE, Dewald GW, Bahn RS, et al. Amplification of RNA and DNA specific erbB in unbalanced 1;7 chromosomal translocation associated with myelodysplastic syndrome [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 1986, 32: 23 - 34
- 冯宝章,雷健玲,杨崇礼,等.白血病前期基因诊断并激素逆转成功 1 例[J].中华内科杂志,1992,31(9):539 - 542
- 冯宝章,雷健玲,林泽嬉,等.大鼠骨髓增生异常综合征(MDS)基因治疗研究[J].中国癌症研究进展,1998,99:171 - 175
- 冯宝章,雷健玲,林泽嬉,等.大鼠骨髓增生异常综合征基因治疗及其机制研究[J].医学研究杂志,2010,39(3):129 - 131

(收稿日期:2013 - 07 - 13)

(修回日期:2013 - 09 - 25)

双腔起搏治疗房室传导阻滞对心脏收缩功能的影响

官文俊 谢 进 许臣洪

摘 要 目的 探讨双心室起搏治疗房室传导阻滞是否会降低病死率及发生率。**方法** 回顾性分析 245 例心力衰竭患者伴房室传导阻滞病例(男性 164 例,女性 81 例),患者年龄 58.5 ± 6.9 岁,将其分为右心室起搏治疗组(120 例),双心室起搏治疗组(125 例),术后随访患者全因病死率、心力衰竭病死率、心力衰竭住院率以及左心室收缩末容积指数增加 15% 的发生率。**结果** 随访时间 24.0 ± 11.6 个月,双心室起搏治疗组全因死亡 13 例(10.4%),心力衰竭死亡 6 例(4.8%),心力衰竭住院 50 例(40%),左心室收缩末容积指数增加 15% 的病例数 33 例(26.4%);右心室起搏治疗组全因死亡 25 例(20.83%),心力衰竭死亡 15 例(12.5%),心力衰竭住院 66 例(55%),左心室收缩末容积指数增加 15% 的病例数 48 例(40%)。因此与右心室起搏治疗相比,双心室起搏治疗能降低心力衰竭患者全因病死率(OR = 0.44, 95% CI: 0.21 ~ 0.91)、心力衰竭病死率(OR = 0.35, 95% CI: 0.13 ~ 0.94)、心力衰竭住院率(OR = 0.55, 95% CI: 0.33 ~ 0.91)以及减少左心室收缩功能恶化率(OR = 0.54, 95% CI: 0.31 ~ 0.92)。**结论** 双心室起搏优于右心室起搏治疗房室传导阻滞伴左心室收缩功能不全的心力衰竭患者。

关键词 心力衰竭 房室传导阻滞 双心室起搏 右心室起搏 左心室收缩功能

[中图分类号] R454 [文献标识码] A

Impact of Dual - chamber Pacing on Cardiac Contractile Function in Patients with Atrioventricular Block. Guan Wenjun, Xie Jin, Xu Chenhong. Jingzhou Central Hospital, Hubei 434020, China

Abstract Objective Whether biventricular pacing can reduce the mortality and morbidity in patients with atrioventricular block.

作者单位:434020 湖北省荆州市中心医院心血管内科

通讯作者:官文俊,电子信箱:jingzhou Central Hospital