

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.05.011

· 临床研究 ·

白血病患者外周血淋巴细胞微核分析

鱼丽莉¹, 王子妍¹, 李娟¹, 宋玮玮², 赵丽¹(1. 兰州大学第一医院中心实验室, 甘肃兰州 730000; 2. 兰州军区总医院血液科, 甘肃兰州 730050)

[摘要] 目的:应用微核分析技术检测初诊白血病患者的遗传损伤。方法:应用细胞周期阻断法检测 54 例初诊白血病患者(CML 11 例,AML-M1 7 例,AML-M2 6 例,AML-M3 4 例,AML-M4 2 例,AML-M5 4 例,AML-M6 2 例,ALL 18 例)和 30 例健康人外周血,以微核率(micronucleus rate, MNR)、微核细胞率(micronucleus cell rate, MCR)、核芽(nuclear bud, Bud)率、核质桥(nucleoplasmic bridge, NPB)率、核分裂指数(nucleus division index, NDI)、凋亡细胞(apoptotic cells, AC)率结合染色体中期分析、融合基因和基因重排检测作为染色体损伤指标分析初诊白血病患者的遗传损伤。结果:54 例初诊白血病患者外周血的 MNR[$(17.368 \pm 1.305)\%$ vs $(7.368 \pm 0.844)\%$], MCR[$(15.418 \pm 1.212)\%$ vs $(5.887 \pm 1.101)\%$], Bud 率[$(8.142 \pm 0.132)\%$ vs $(0.404 \pm 0.404)\%$], NPB 率[$(5.724 \pm 0.874)\%$ vs $(0.034 \pm 0.034)\%$], NDI[$(1.722 \pm 0.062)\%$ vs $(2.282 \pm 0.324)\%$], AC 率[$(2.167 \pm 0.333)\%$ vs $(0.167 \pm 0.667)\%$], 异常染色体检出率(24.00%), 融合基因或基因重排阳性率(18.00%)均明显异于健康人($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:白血病患者发病初期即有不同程度的遗传损伤,提示染色体不稳定造成的遗传损伤与白血病发病密切相关。

[关键词] 微核;白血病;细胞周期阻断法;遗传损伤

[中图分类号] R733.7; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)05-0541-04

Analysis of micronucleus in peripheral blood lymphocytes of leukemia patients

YU Li-li¹, WAN Zi-yan¹, LI Juan¹, SONG Wei-wei², ZHAO Li¹(1. Central Laboratory, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China; 2. Department of Hematology, General Hospital of Lanzhou Military Area Command, Gansu 730050, Lanzhou, China)

[Abstract] **Objective:** To study the genetic damage of preliminarily diagnosed leukemia patients by micronucleus analysis technology. **Methods:** Peripheral blood of 54 preliminarily diagnosed leukemia patients (11 CML patients, 7 AML-M1 patients, 6 AML-M2 patients, 4 AML-M3 patients, 2 AML-M4 patients, 4 AML-M5 patients, 2 AML-M6 patients, and 18 ALL patients) and 30 healthy volunteers were collected and examined by cell cycle block test. The genetic damages of patients were assessed by micronucleus rate (MNR), micronucleus cell rate (MCR), nuclear bud (Bud) frequency, nucleoplasmic bridge (NPB) frequency, nuclear division index (NDI), and apoptotic cell (AC) rate combined with chromosome metaphase, gene fusion and gene rearrangement analysis. **Results:** The chromosome damages in 54 leukemia patients were significantly different from those in the 30 healthy volunteers, with MNR being $(17.368 \pm 1.305)\%$ vs $(7.368 \pm 0.844)\%$, MCR being $(15.418 \pm 1.212)\%$ vs $(5.887 \pm 1.101)\%$, Bud frequency being $(8.142 \pm 0.132)\%$ vs $(0.404 \pm 0.404)\%$, NPB frequency being $(5.724 \pm 0.874)\%$ vs $(0.034 \pm 0.034)\%$, NDI being $(1.722 \pm 0.062)\%$ vs $(2.282 \pm 0.324)\%$, AC rate being $(2.167 \pm 0.333)\%$ vs $(0.167 \pm 0.667)\%$, abnormal chromosome detection rate being 24.00%, gene fusion or gene rearrangement positive rate being 18.00% ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Leukemia patients show different degrees of inheritance chromosome damages in the initial stage, indicating that the inheritance damage caused by chromosomal instability is related to leukemia pathogenesis.

[Key words] micronucleus, leukemia, cell cycle block test, genetic damage

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(5): 541-544]

[基金项目] 甘肃省技术研究与开发专项计划基金(No. CYA013)。Project supported by the Technology Research and Development Special Foundation of Gansu Province (No. CYA013)

[作者简介] 鱼丽莉(1984-),女,甘肃省平凉市人,硕士研究生,主要从事白血病发病机制研究, E-mail: yulili841010@163.com

[通信作者] 赵丽(ZHAO Li, corresponding author), E-mail: zhaoli@lzu.edu.cn

微核试验是常用的遗传毒理学方法,能客观反映机体受环境诱变因子的作用所造成的遗传损伤,已广泛应用于遗传、食品、药物、环境等多领域的遗传毒性评估,以及作为有害职业和生活环境暴露人群遗传损害的生物标志物^[1-2]。

已有研究^[3-7]显示,肿瘤患者的外周血淋巴细胞微核率较健康人为高,通过外周血淋巴细胞微核检测可预测早期癌肿的发生和用作肿瘤化、放疗疗效的监测。白血病患者中有一部分存在典型的染色体异常,某些染色体异常成为白血病发病的直接原因,故可推测各种原因造成的遗传损伤可能是白血病发病的一个重要机制。Hamurcu 等^[8]对 20 例初诊白血病患者的外周血淋巴细胞微核率进行检测,显示该批患者淋巴细胞微核率较正常人为高,认为可能与其遗传不稳定性及 DNA 修复能力的缺乏有关。本实验应用微核分析技术结合染色体中期分析及融合基因和基因重排检测分析初诊白血病患者遗传损伤。

1 材料与方法

1.1 实验对象

2008 年 12 月至 2009 年 3 月选择甘肃省 3 家三级甲等医院初诊白血病患者 54 例,其中男性患者 34 例,女性患者 20 例。其分型如下:CML 11 例,AML-M1 7 例,AML-M2 6 例,AML-M3 4 例,AML-M4 2 例,AML-M5 4 例,AML-M6 2 例,ALL 18 例。与之对照的健康人 30 例,选择健康人的标准:(1)年龄 18~45 岁,男女均可;(2)非放射工作者,近 3 个月未接受医疗诊断照射;(3)近 1 个月未感染病毒,未接触有害化学物质或服药史;(4)无高血压、糖尿病、慢性肝炎、哮喘等慢性病;(5)无烟、酒嗜好。所有参试人员均签署知情同意书,并报医院伦理委员会审批同意。

1.2 主要实验试剂

肝素购自华美生物工程公司,RPMI 1640 购自美国 Gibco 公司,小牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司,细胞松弛素 B(Cyt-B)、Giemsa 染液购自 Sigma 公司,EB、DNA 基因组抽提试剂盒、PCR 扩增试剂盒、RNA 基因组抽提试剂盒、AMV 一步法 RT-PCR 试剂盒购自上海生工生物工程有限公司,琼脂糖购自意大利 BBI 公司。

1.3 微核分析技术检测淋巴细胞微核情况

肘静脉抽取外周血 3~5 ml,置于无菌肝素抗凝管中,采用细胞周期阻断法,将其直接接种入 RPMI 1640 混合培养,置于(37.0±0.5)℃温箱内避光培养 44 h,加入 Cyt-B 6 μg/ml(终质量

浓度),继续避光培养至 72 h 终止。制片、固定、瑞氏-姬姆萨染色。

油镜下,按 Fenech 法进行微核计数。在 1 000 倍油镜下,每张玻片计数 1 000 个双核细胞,全片若不够 1 000 个双核细胞,则按片上实际双核细胞计数,计算双核细胞微核率及微核细胞率。

淋巴细胞微核分析各项指标如下:(1)微核细胞率(micronucleus cell rate, MCR), $MCR(\%) = \text{含微核细胞数} / \text{双核淋巴细胞总数} \times 1\,000\%$;(2)微核率(micronucleus rate, MNR), $MNR(\%) = \text{微核数} / \text{双核淋巴细胞总数} \times 1\,000\%$;(3)核芽(nuclear bud, Bud)出现率;(4)核质桥(nucleoplasmic bridge, NPB)率,双核细胞间有相连的条带为核质桥;(5)核分裂指数(nuclear division index, NDI),计数 400 个淋巴细胞, $NDI = (1N + 2N \times 2 + >2N \times 4) / 400$,其中 1N 为单核细胞数,2N 为双核细胞数,>2N 为多核的细胞数;(6)凋亡细胞(apoptotic cells, AC):计数 500 个细胞中的凋亡细胞。玻片的观测由 1 个人完成。

1.4 G 显带染色体中期分析

取外周血 3~5 ml 加入无菌小瓶中(内含 1640 培养液、肝素),离心后将白细胞层吸出,加入培养瓶中混合培养,混匀后置于(37.0±0.5)℃温箱内避光培养 24 h,终止培养前 2 h 加入秋水仙素(终质量浓度 5 μg/ml),取出培养物。低渗、预固定、固定、制片,室温下 24 h 后进行 G 显带染色体中期分析,计算异常染色体检出率。

1.5 PCR 技术检测融合基因及基因重排

1.5.1 检测 BCR/ABL、PML/RAR α 融合基因 分离全血中单个核细胞后提取 RNA 基因组,按试剂盒要求加样,总体积 50 μl,进行 RT-PCR 扩增,取 5~7 μl 扩增产物经 2% 琼脂糖电泳,EB 染色,紫外灯下观察结果。

1.5.2 检测 IgH 基因重排 分离全血中单个核细胞后提取 DNA 基因组,按试剂盒要求加样,总体积 25 μl,进行 PCR 扩增,取 5~7 μl 扩增产物经 2% 琼脂糖电泳,EB 染色,紫外灯下观察结果。

1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验;两组或多组间率的比较采用 χ^2 检验及 Fisher 精确概率法, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 初诊白血病患者淋巴细胞微核形态的变化

应用周期阻断法检测初诊白血病患者和健康人

外周血淋巴细胞,出现如图 1 所示的双核细胞、含微核的双核细胞、核质桥、核芽及多核细胞。

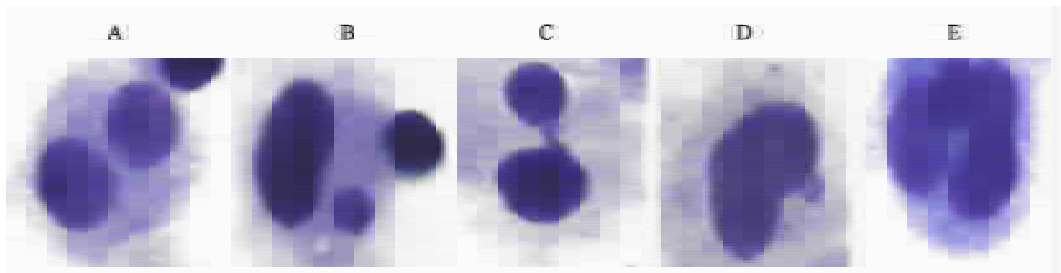


图 1 淋巴细胞微核形态的变化(Giemsa 染色, ×1 000)

Fig. 1 Changes of micronucleus of peripheral blood lymphocytes (Giemsa, ×1 000)

A: Binucleated cells; B: Micronucleated binucleated cells; C: Nucleoplasmic bridge; D: Nuclear bud; E: Multinucleated cells

2.2 初诊白血病患者及健康人微核分析的比较

检测结果(表 1)显示,初诊白血病患者的 MNR、MCR、Bud 出现率、NPB 出现率、NDI 及 AC 出现率均明显异于健康人,两组之间差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。由此证明白血病患者发病初期即有不同程度的遗传损伤。

2.3 初诊白血病患者异常染色体明显增加

G 显带染色体中期分析(图 2)发现,初诊白血病患者的异常染色体检出率为 24.0%,与健康人(0)相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 初诊白血病患者融合基因及基因重排显著增加

应用 PCR 技术检测初诊白血病患者的 BCR/ABL、PML/RAR α 融合基因和 IgH 基因重排,结果(图 3)发现,其融合基因或基因重排阳性率为 18.0%,与健康人相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

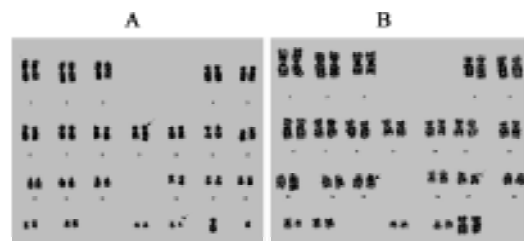


图 2 初诊白血病患者的异常染色体

Fig. 2 Chromosome abnormalities in preliminarily diagnosed leukemia patients

A: $t(9;22)(q34;q11)$; B: $t(15;17)(q21;q22)$

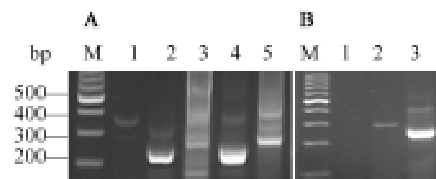


图 3 初诊白血病患者的 BCR/ABL⁺(A)、PML/RAR α ⁺(B)融合基因和 IgH 基因的重排

Fig. 3 Fusion BCR/ABL and PML/RAR α gene and IgH rearrangement in preliminarily diagnosed leukemia patients

A. M: Marker; 1: b3a2; 2, 4: β -actin; 3,5: b2a2.

B. M: Marker; 1: PML/RAR α (-);

2: PML/RAR α (+); 3: β -actin

表 1 白血病患者及健康人微核分析的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 1 Comparison of micronucleus analysis between leukemia patients and healthy controls

Index	Preliminarily diagnosed leukemia patients	Healthy control
MNR	1.737 \pm 0.131 **	7.368 \pm 0.844
MCR	0.154 \pm 0.012 **	0.589 \pm 0.110
Bud	8.142 \pm 0.132 **	0.404 \pm 0.404
NPB	5.724 \pm 0.874 **	0.034 \pm 0.034
NDI	1.722 \pm 0.062 *	2.282 \pm 0.324
AC	2.167 \pm 0.333 *	0.167 \pm 0.667

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs healthy control

3 讨论

各种原因造成的遗传损伤,包括染色体的丢失、异位、断裂、分离改变等引起的基因突变是白血病发病中的重要机制之一。胞质分裂阻断微核实验(cytokinesis-blocked micronucleus, CBMN)是一种快速、灵敏检测染色体损伤的实验,最初仅用于检测微核(micronucleus, MN)。MN 是来自细胞分裂过程中断

裂、缺失或者滞后的染色体, 细胞周期关卡缺陷也能导致 MN 的形成, 核芽脱落、核质桥也可以断裂而形成 MN, 营养性或 DNA 甲基转移酶抑制所诱发的 DNA 低甲基化可通过染色体丢失或染色体断裂导致 MN 的形成^[9]。MN 形成是在细胞分裂末期与染色体断裂或纺锤体损伤有关, 它较有规律地出现在各种良恶性肿瘤及血液病患者的外周血淋巴细胞胞质中^[10-12]。因此, 外周血 MN 测试法是研究染色体畸变及细胞损伤的简便而敏感的指标之一。Fenech^[13]提出, 可用多种形态学标准来评价遗传毒性特点, 包括检测核芽、核质桥、核分裂指数和凋亡细胞, 从而测定因遗传缺陷、营养不良或外源性遗传毒物所引起的染色体不稳定性表型及细胞活性改变。

本实验对初诊白血病患者进行 MN 分析以评价其遗传损伤, 结果提示, 初诊白血病患者的外周血微核细胞率、微核率、核芽出现率、核质桥出现率、凋亡细胞出现率、异常染色体检出率、融合基因或基因重排阳性率均高于健康人相应检测指标 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。由此证实, 白血病患者发病初期即有明显的遗传损伤。

核芽和(或)核质桥出现率增高提示幼淋细胞有丝分裂缺陷, 即在有丝分裂过程中染色质不完全分离, 从而产生缺陷子细胞。染色质不完全分离的结果有可能终止有丝分裂, 如果有丝分裂继续进行, 则子细胞可发生细胞遗传物质的增加或缺失, 因此核芽和核质桥形态学改变与其生物学异常密切相关。核芽出现往往与基因扩增有关, 核芽形成过程是细胞去除放大的或多余的 DNA 的机制, 因此是基因放大、扩增或基因剂量改变的生物标志。核质桥来自双着丝粒染色体, 在双着丝粒染色体内着丝粒被拉到分裂后期细胞相反的极, 因此是 DNA 错配修复、染色体重排或端粒的末端融合的生物标志。核芽作为基因扩增的生物标志, 核质桥作为 DNA 错配修复、染色体重排或端粒的末端融合的生物标志, 推测其可能与白血病发病机制密切相关, 核芽、核质桥的检测可用于白血病的早期诊断^[14]。BCR/ABL、PML/RAR α 融合基因和 IgH 基因重排检测特异性较强, 但对于其他基因扩增则无法检测。染色体中期分析实验周期较长, 对操作人员及设备要求较高。MN 实验同时检测微核细胞率、微核率、核芽出现率、核质桥出现率、凋亡细胞出现率等多项指标, 较准确地反应出染色体损伤、基因改变等遗传学损伤改变, 较染色体中期分析及融合基因及基因重排检测方法简便, 结果可靠。微核率及微核细胞率还与染色体异常检出率有相关性, 数据之间的分布也具

有良好的一致性, 在进行染色体中期分析的同时进行 MN 检测有助于进一步评估患者的遗传损伤, 对预测人类早期致癌危险性或易感性具有较好的应用价值, 在白血病患者发病机制研究和早期诊断中具有一定的应用价值。

[参考文献]

- [1] 曹佳. 微核试验在中国的应用、发展与展望 [J]. 遗传, 2003, 25(1): 73-76.
- [2] Iarmarcovai G, Botta A, Orsière T. Changes in chromosome number, genetic instability, and occupational exposures [J]. Bull Cancer, 2007, 94(4): 381-388.
- [3] 安菊生, 王德华. 致突变试验在恶性肿瘤化疗监测中的应用 [J]. 癌变·畸变·突变, 2006, 18(1): 78-80.
- [4] Nersesyan AK. Possible role of the micronucleus assay in diagnostics and secondary prevention of cervix cancer: A minireview [J]. Tsitol Genet, 2007, 41(5): 64-66.
- [5] Varga D, Vogel W, Bender A, Surowy H, Maier C, Kreienberg R, et al. Increased radiosensitivity as an indicator of genes conferring breast cancer susceptibility [J]. Strahlenther Onkol, 2007, 183(12): 655-660.
- [6] 叶伟军, 闵华庆, 曹新平, 陈昆田. 松胞素阻滞微核法检测鼻咽癌细胞株放射敏感性的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(21): 1612-1616.
- [7] 于雷, 王铁君, 王剑锋, 刘丽波, 鞠桂芝. 食管癌患者放疗前后外周血淋巴细胞染色体畸变率和微核率的检测及临床意义 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2007, 33(4): 737-740.
- [8] Hamurcu Z, Dönmez-Altuntas H, Patiroglu T. Basal level micronucleus frequency in stimulated lymphocytes of untreated patients with leukemia [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2008, 180(2): 140-144.
- [9] 杜峰涛, 李林. 细胞微核形成机理探讨 [J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(4): 19-22.
- [10] Duffaud F, Orsière T, Villani P, Pelissier AL, Volot F, Favre R, et al. Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients [J]. Mutagenesis, 1997, 12(4): 227-231.
- [11] El-Zein RA, Schabath MB, Etzel CJ, Lopez MS, Franklin JD, Spitz MR. Cytokinesis-blocked micronucleus assay as a novel biomarker for lung cancer risk [J]. Cancer Res, 2006, 66(12): 6449-6456.
- [12] Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans [J]. Carcinogenesis, 2007, 28(3): 625-631.
- [13] Fenech M. The *in vitro* micronucleus technique [J]. Mutat Res, 2000, 455(1/2): 81-95.
- [14] Fenech M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer [J]. Drug Discov Today, 2002, 7(22): 1128-1137.

[收稿日期] 2010-05-28

[修回日期] 2010-07-12

[本文编辑] 王莹