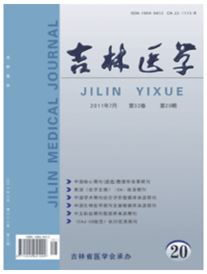
特色服务 Serves
在线投稿 投稿指南
绿色通道 特色专区
服务流程 常见问题
编辑中心 期刊阅读
期刊约稿
中国社区医师
医学信息
吉林医学
按摩与康复医学
临床合理用药杂志
推荐期刊
吉林医学



期刊介绍
在线阅读
在线订阅
在线投稿
职称晋升政策汇总
让您的晋升不留下半点遗憾

血液内科

伴有69染色体易位急性髓系白血病患者DEK-CAN融合基因

发表时间：2011-11-24 9:41:26 来源：创新医学网医学编辑部推荐

作者：汪亚伦,王彤,许风,江岩,王杰　　作者单位：沈阳医学院生化及分子生物学教研室，沈阳 110034; 1东京大学医学院血液研究室，日本东京

【摘要】本研究旨在探讨急性髓系白血病 (AML) 患者6;9染色体易位与DEK-CAN融合基因表达之间的关系及临床意义。患者骨髓细胞短期培养后按常规方法制备染色体，采用R显带技术进行染色体核型分析。用逆转录巢式聚合酶链反应(RT-nest-PCR)对4例AML患者的骨髓或外周血单个核细胞DEK-CAN融合基因表达进行了分析，并对其中3例行异体骨髓移植(allo-BMT)患者进行动态随访。结果表明：4例急性髓系白血病患者为t(6;9)(p23;q34)易位;4例初诊、再发及完全缓解期患者均不同程度检出DEK-CAN融合基因，占100%;其中初诊、再发期表达明显增强，完全缓解期减弱;3例患者allo-BMT后1-24个月均表达DEK-CAN mRNA。临床资料显示4例AML患者中2例于CR后1-24个月复发(其中1例接受异体骨髓移植)、死亡，其余2例完全缓解，在治疗中先后接受异体骨髓移植，现仍然生存。结论： DEK-CAN基因是AML发病的分子基础，检测DEK-CAN融合基因对于AML的诊断、疗效观察及预后判断有重要意义。

【关键词】 急性髓系白血病

Abstract This study was aimed to explore the relationship of 6;9 chromosome translocation with DEK-CAN fusion gene expression in patients with acute myeloid leukemia (AML) and its clinical significance. Chromosome specimens were prepared by routine method after short-term culture of bone marrow cells; karyotype analysis was performed by R banding technique; the expression of fusion gene DEK-CAN was analyzed by RT-nested-PCR in mononuclear cells of bone marrow or peripheral blood of 4 AML patients，for 3 patients received allo-BMT out of 4 patients the dynamic follow-up was performed.The results indicated that t(6;9)(p23;q34) was confirmed by chromosome karyotype analysis in the four AML patients.The DEK-CAN fusion gene was found during in all four de novo，relapsed and CR patients (100%).And the expression of DEK-CAN fusion gene enhanced apparently in de novo and relapsed patients，and weakened in CR patient.DEK-CAN mRNA was found in the three patients during 1-24 months after allo-BMT.Clinical data showed 2 patients relapsed and died after CR for 1-24 months; the other two patients received allo-BMT got CR and still survive.It is concluded that DEK-CAN fusion gene is the molecular basis in pathogenesis of AML.The detection of DEK-CAN fusion gene is significant for diagnosis of AML，evaluation of curative effect，and prediction of prognosis.

Key words AML; 6;9 translocation; DEK-CAN fusion gene

t(6;9)(p23;q34)是造血系统罕见的随机染色体异常，国外文献中只有为数很少的病例记载[1-4]，国内尚无报道。该染色体易位主要见于急性髓系白血病和骨髓增生异常综合症(MDS)，患者多见于年轻人，预后不良[1，2]。另外，由于染色体易位，6号染色体上的DEK基因与9号染色体上的CAN基因结合形成DEK-CAN融合蛋白[5]。该蛋白与白血病的发生有密切关系。我们曾报道了采用常规细胞遗传学和巢式PCR技术，成功检出1例急性粒-单细胞白血病(AMMOL，FAB分型M4)患者具有t(9;12)(q22;p13)

我要立即投稿
--最便捷的绿色通道
在线客服....
QQ交谈1254635326
QQ交谈4006089123
545493140(重要)
400-6089-123 68590972

易位并存在有DEK-CAN融合基因[6]。本次我们利用巢式PCR技术对4例新发现的伴有该染色体异常的AML患者DEK-CAN融合基因的表达进行了研究，以探讨其在恶性血液病发病中的作用。

材料和方法

病例

4例急性髓系白血病患者均为日本东京大学附属医院收治的初发病例，其中男2例，女2例，年龄分别为6，13，14，39岁。临床诊断根据患者的临床表现、血常规、骨髓象和细胞化学检测结果并参照免疫分型结果确定，其中急性髓系白血病 M2 3例，急性粒-单核细胞白血病 M4 1例。4例患者均按照高危方案化疗，完全缓解(CR)后，交替使用中剂量阿糖胞苷、鬼臼乙叉甙(VP16)或米托蒽醌等药物巩固强化治疗。经治疗后2例死亡，2例存活中。死亡患者中1例给予ATRA+As2O3治疗后获完全缓解，但13个月后血象、骨髓显示复发，接受异体骨髓移植，3个月后死亡，活存期30个月;另外1例CR后1-3个月后2次复发，治疗中死亡，活存期16个月。2例活存的患者中，1在确例诊5个月后接受异体骨髓移植并结合化疗，在术后3个月和5个月复查血象，骨髓为完全缓解状态，己生存5个月。另1例化疗后2次复查为完全缓解，治疗7个月后接受异体骨髓移植，现已生存12个月，临床资料见附表。

染色体核型分析

治疗前抽取骨髓标本，采用短期培养法制备染色体标本，应用R显带技术进行核型分析[7]。每例至少分析20个中期细胞：核型异常按“人类染色体同际命名体制(ISCN 1995)”进行识别和描述。

DEK-CAN融合基因的检测

采用巢式RT-PCR方法检测。

引物

PCR 引物设计见图1。第一轮PCR反应引物DEK-1和CAN-1的序列分别为5′ -CCTACAGATGAAGAGTTAA-3′ 和5′ -TCTTCCTCTGTTGGTTGATG-3′ 。第二轮PCR反应引物DEK-2和CAN-2的序列分别为5′ -GGCCAGTGCTAACTTGG-3′ 和5′ -GTGTCTCTCGCTCTGG-3′ 。

RNA提取

取患者骨髓血1 ml，淋巴细胞分离液(上海恒信化学试剂有限公司产品)分离单个核细胞，按照TRIzoL产品说明书进行总mRNA提取[8]。抽提的RNA 用DEPC水溶解，实验选用样本为经紫外分光光度计测定其RNA 溶液A260/280> 1.8，且经RNA 酶消化之后在1% 琼脂糖凝胶上进行电泳，在紫外灯下观察未发现有RNA 及其它条带存在。-20℃ 保存备用。

逆转录反应

按照MMLV逆转录酶产品说明书，将细胞总RNA逆转录为cDNA。标本总RNA 2 μg，6核苷酸随机引物100 ng，加DEPC 处理水至20 μl，72℃变性5分钟，另加5×合成第一链缓冲液8 μl，10 mmol/L dNTP 1 μl，RNA 酶抑制剂RNasin 50 U，AMV RTase 10 U，总反转录体系40 μl，37℃反应60分钟，4℃保存。

PCR反应

50 μl反应体系，第1轮PCR反应30个循环(95℃预变性5分钟，94℃ 变性60秒，56℃退火 60秒，72℃延伸 90秒)。第2轮PCR反应25个循环(95℃预变性 5分钟，94℃变性 60秒，50℃退火 45秒，72℃延伸 2分钟)，最后72℃ 10分钟结束反应。

Table.Clinical and laboratory data of AML patients with t(6;9) chromosome translocation(略)

电泳 取PCR 产物13 μl，加溴化乙锭2 μl，于2 % 琼脂糖凝胶上电泳20 分钟，PBR322 (HindⅢ)作为标志物，用紫外投射仪分析图像并照相。

结 果

染色体核型

对4例AML进行了染色体核型分析，20个中期分裂相的所有细胞均显示t(6;9)(p23;q34)染色体异常(图2)。

DEK-CAN mRNA的变化

第2次PCR扩增产物电泳时在268 bp有特异条带，表达CAN mRNA，在182 bp有特异条带为DEK mRNA，4例初发或常规治疗AML患者中，DEK-CAN融合基因检测结果均呈阳性，阳性率为100%(图3)。

3例进行allo-BMT患者，在初诊后1-14个月用巢式RT-PCR分析动态变化。以病例3为例，初诊及复发期DEK-CAN mRNA表达明显增强，完全缓解期时减弱(图4)。

讨 论

血液系统恶性疾病病程中，常出现某种非随机性染色体异常，这些染色体的相互易位大部分与恶性血液疾病的某一组织学或免疫学亚型或与特异的临床特征相联系，可能在人类白血病的发病机理中起着关键作用。

染色体易位t(6;9)(p23;q34)是造血系统罕见的随机染色体异常，国外文献中只有为数不多的病例记载，国内尚无报道。Shapira等[9]报道，该染色体易位主要发生于AML(M1，M2或M4)中，发生率为0.5%-4%。因此，t(6;9)与AML之间有着密切相关性。据报道，在骨髓增生异常综合征(MDS)RAEB型亦可发现t(6;9)易位[9]。多数报道显示，AML血液学的特征主要表现为初诊时骨髓中嗜碱细胞增加[10]，但也有一些未见增加的报道，在我们的4例患者中均未见嗜碱细胞增加。

随着急性白血病化疗方案的改善和造血干细胞移植技术的进展，急性白血病的完全缓解(CR)率明显提高。然而仍有许多CR患者在数年内复发，其主要原因是血液学CR后体内仍残留l06-109白血病细胞，称为微小残留病(MRD)。有学者认为，MRD是血液学CR乃至持续完全缓解(CCR)期间白血病复发的根源[11]。RT-nested-PCR方法对于检测AML残留白细胞是一种相当灵敏和可靠的方法。据文献报道灵敏度可高达106-107水平，比染色体技术更加灵敏[12]。在预实验中我们利用RT-nested-PCR扩增摸索了染色体t(6;9)易位的最低检出值。结果显示样本中提取的总mRNA稀释至10 pg，仍可以检测到DEK-CAN mRNA (结果未发表)。总之，由于PCR可以扩增小于l0 pg的基因总mRNA，从而大大提高了检测的敏感性，可使白血病微小残留疾病的早期诊断成为可能。我们在4例患者中成功检测到DEK-CAN融合基因，说明RT-nested-PCR方法可以检出白血病患者常见的染色体畸变产生的融合基因，它可以用于AML患者CR后微小残留病变(MRD)的检测。

t(6;9)(p23;q34)易位AML患者除了必要的化疗之外，是否需要同时进行骨髓移植或外周血干细胞移植的报道很少，治疗上尚无定论[13]。但从单纯化疗的治疗效果不良来看，在第1次完全缓解期后，骨髓移植也应当作为一个重要的治疗手段。

近年来，分子生物学研究发现的癌基因在染色体上定位使肿瘤发病机制研究有了一些进展。研究发现，t(6;9)易位为6号染色体上的DEK基因与9号染色体上的CAN基因交互易位所致，6p23上的DEK基因为40 kb，而9号染色体上的基因超过130 kb[14]。对17例伴t(6;9)的病例分析显示，断裂点分别集中于DEK基因1个特异的9 kb内含子(intron containing breakpoints on chromosome 6，称icb-6)和CAN基因的1个7.5 kb的内含子(称ich-9)中[15]。由于染色体易位，产生的DEK-CAN融合基因可能在伴有t(6;9)易位的AML的发病机制中扮演一个重要的角色。本实验中，我们应用巢式RT-PCR方法检测了4例伴有t(6;9)(p23;q34) 染色体易位的急性髓系白血病患者DEK-CAN融合基因的表达，发现DEK-CAN融合基因不仅存在于初发期，在治疗后的完全缓解期也有表达。目前所有相关研究均显示，初发期及完全缓解期伴有DEK-CAN融合基因表达的急性白血病患者对治疗反应差，患者生存期短，预后极差，再发后死亡为100%。我们的4例中2例复发后均在短期内死亡，与文献一致，表明DEK-CAN融合基因可作为患者预后判断的重要参考指标。

染色体易位是恶性肿瘤最常见的分子遗传学改变，近年的研究使人们对染色体易位与肿瘤的发生的关系有了更深人的认识。一方面，染色体易位可使原癌基因异常表达;另一方面，染色体易位使易位后相邻基因融合形成新的融合基因。虽然融合基因在恶性肿瘤发生中的作用和机制尚未完全清楚，但很多学者认为，融合基因的形成及其表达产物可能是某些恶性肿瘤发生的重要原因。目前已发现很多血液系统和软组织恶性肿瘤可形成肿瘤特异的融合基因。

尽管t(6;9)(p23;q34)的分子生物学研究取得了重大进展，但尚不完全清楚DEK-CAN融合基因对肿瘤发生行为有怎样的生物学影响，以及编码的蛋白在AML发生过程中发挥何种作用，这些都有待于进一步研究。相信t(6;9)(p23;q34)染色体易位机制的研究将为阐明白血病发病机制及最终攻克癌肿奠定基础。

【参考文献】

1 Shearer BM，Knudson RA，Flynn HC，et al. Development of a D-FISH method to detect DEK/CAN fusion resulting from t(6;9)(p23;q34) in patients with acute myelogenous leukemia.Leukemia，2005; 19:126-131

2 Tobal K，Frost L，Liu Yin JA.Quantification of DEK-CAN fusion transcript by real-time reverse transcription polymerase reaction in patients with t(6;9) acute myeloid leukemia.Haematologica，2004; 89: 1267-1269

3 Ostergaard M，Stentoft J，Hokland P.A real-time quantitative RT-PCR assay for monitoring DEK-CAN fusion transcripts arising from translocation t(6;9) in acute myeloid leukemia.Leuk Res，2004; 28: 1213-1215

4 Maeda T，Kosugi S，Ujiie H，et al. Localized relapse in bone marrow in a post-transplantation patient with t(6;9) acute myeloid leukemia.Int J Hematol，2003; 77: 522-525

5 von-Lindern M，Breems D，van-Baal S，et al. Characterization of the translocation breakpoint sequences of two DEK-CAN fusion genes present in t(6;9) acute myeloid leukemia and a SET-CAN fusion gene found in a case of acute undifferentiated leukemia.Genes Chromosomes Cancer，1992; 5: 227-234

6 Tatsumi K，Xu F，Ohnishi H，et al.Acute myelomonocytic leukemia(M4) with t(6;9) (p23;q34) followed by detection of minimal residual disease using DEK-CAN mRNA.J J P H，1998; 12: 190-194

7 Mrozek K，Tanner SM，Heinonen K，et al. Molecular cytogenetic characterization of the KG-1 and KG-1a acute myeloid

leukemia cell lines by use of spectral karyotyping and fluorescence in situ hybridization.Genes Chromosomes Cancer，2003; 38: 249-252

8 龚辉，刘文励，徐慧珍等.急性白血病患者骨髓细胞CHFR基因表达及其临床意义.中华医学杂志，2005; 85:1085-1088

9 Shapira MY，Hirshberg B，Amir G，et al.6;9 translocation in myelodysplastic syndrome.Cancer Genet Cytogenet，1999; 112:57-59

10 Boer J，Mahmoud H，Raimondi S，et al.Loss of the DEK-CAN fusion transcript in a child with t(6;9) acute myeloid leukemia following chemotherapy and allogeneic bone marrow transplantation.Leukemia，1997; 11:299-300

11 Potter MN，Cross NC，van-Dongen JJ，et al. Molecular evidence of minimal residual disease after treatment for leukaemia and lymphoma: an updated meeting report and review.Leukemia，1993; 7:1302-1314

12 Yokota H，Kitamura K.The genetic diagnosis of hematopoietic malignancy by polymerase chain reaction method.Rinsho Byori，2000; 48:708-715

13 Garcon L，Libura M，Delabesse E，et al. DEK-CAN molecular monitoring of myeloid malignancies could aid therapeutic stratification.Leukemia，2005; 19:1338-1344

14 Makita M，Azuma T，Hamaguchi H，et al. Leukemia-associated fusion proteins，dek-can and bcr-abl，represent immunogenic HLA-DR-restricted epitopes recognized by fusion peptide-specific CD4+ T lymphocytes.Leukemia，2002;16: 2400-2407

15 von-Lindern M，van-Baal S，Wiegant J，et al.Can，a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis，may be activated by fusion of its 3′ half to different genes: characterization of the set gene.Mol Cell Biol，1992; 12:3346-3355

最热点击

考试宝典-高分练兵场

揭秘论文“低价”根源

医学编辑中心

邮箱投稿视频教程

相关文章

伴有69染色体易位急性髓系白血病患者DEK-CAN融合基因	2011-11-24
中期因子在急性髓系白血病患者的表达及临床意义	2011-9-27
急性髓系白血病T淋巴细胞亚群及NK细胞的变化及其临床意义	2010-8-17
FLAG方案治疗复发或难治性急性髓系白血病临床观察	2010-7-13

加入收藏夹 复制给朋友 分享到外站

评论内容

请文明上网，文明评论。

发表评论 重 置

上一页 当前第1页，共1页 下一页

关于我们 | 合作伙伴 | 特色服务 | 客户留言 | 免责声明 | 学术团队 | 学术动态 | 项目合作 | 招贤纳士 | 联系方式

电 话：400-6089-123 029-68590970 68590971 68590972 68590973 传 真：029-68590977
服务邮箱：vip@ yixue360.com QQ：1254635326 （修稿） QQ：545493140 （项目合作）
Copyright @ 2007 - 2012 www.yixue360.com， All Rights Reserved 陕ICP备:08003669号

匿名交谈