

SALL4 基因在恶性血液肿瘤中的表达

王谷云 吴巨峰 唐瑞梅 姚红霞

摘要：目的 分析不同类型恶性血液肿瘤患者体内 SALL4 基因的表达特点。**方法** 以 FQ-PCR 测定 32 例恶性血液肿瘤患者和 11 例正常对照的单个核细胞上 SALL4mRNA 表达。**结果** 急性淋巴细胞白血病(ALL)患者 SALL4 mRNA 表达量为 0.1055,其中 4 例 T-ALL 均为 0.0000。非霍奇金淋巴瘤(NHL)患者 SALL4 mRNA 表达量为 0.0965,且阳性表达均为 B 系淋巴瘤,T 系淋巴瘤均未检测出 SALL4mRNA。8 例多发性骨髓瘤(MM)患者及 11 例正常对照者个别标本表达 SALL4mRNA 弱阳性,其表达量分别为 0.0000 和 0.0000。ALL 和 NHL 之间 SALL4 mRNA 的表达比较差异无统计学意义($P>0.05$)。ALL 和 NHL 组与 MM 和对照组间 SALL4mRNA 的表达差异存在统计学差异($P<0.05$),对照组与 MM 组组间无统计学意义($P>0.05$)。**结论** SALL4 在部分恶性血液肿瘤的发生过程中可能起着十分重要的作用。

关键词 SALL4 基因表达 恶性血液肿瘤

中图分类号 R733.7 **文献标识码** B **文章编号** :1009-9727(2011)10-1277-02

The expression of SALL4 in different hematologic malignant tumor. WANG Gu-yun ,WU Ju-feng ,TANG Rui-mei et al.(Hainan Provincial people's Hospital ,Haikou 570311 ,Hainan P. R. China)

Abstract: Objectives To survey the expression level of SALL4 mRNA in the patients with different hematologic malignant tumor. **Methods** FQ-PCR method was used for detecting SALL4 mRNA expression in mononuclear cells of 32 patients with different hematologic malignant tumor and 11 normal controls. **Results** The positive rates of SALL4 mRNA expression were 0.1055 in patients with ALL ,0.0965 in patients with NHL ,0.0000 in patients with MM and normal control. In the positive rates of SALL4 mRNA expression with ALL and NHL ,the differences were not statistically significant ($P>0.05$). In the expression rates of the previous two groups with MM and normal controls respectively ,the differences were statistically significant ($P<0.05$). In the positive rates of SALL4 mRNA expression with MM and normal controls ,the differences were not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusions** The results suggest that the SALL4 may play all important role in genesis and development of hematological malignant diseases.

Key words: SALL4; Gene expression; hematological malignant diseases

恶性肿瘤是目前全世界公认为危害人类健康最严重的一类疾病^[1,2]。在欧美一些国家恶性肿瘤的死亡率仅次于心血管系统疾病而居第二位,在我国则占全部死因的第一位^[3,4]。研究表明,SALL4 基因的异常表达可能参与肿瘤的发生^[5-8]。本研究分析 2009 年 32 例恶性血液肿瘤患者和 11 例健康对照者中 SALL4 基因的表达情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本材料 所有标本取自 2009 年 1 月~2009 年 12 月在海南省人民医院住院恶性血液肿瘤患者及门诊健康体检者的骨髓。年龄在 12~78 岁。病例包括 12 例急性淋巴细胞白血病组 (acute lymphoblastic leukemia, ALL)、12 例非霍奇金淋巴瘤组 (non-Hodgkin's lymphoma, NHL)、8 例多发性骨髓瘤组 (multiple myeloma, MM)。急性淋巴细胞白血病诊断标准按照 1994 年在法国召开的欧洲白血病免疫学分型协作组会议提出的四型 21 类法;淋巴瘤按病理组织学确诊,可见正常淋巴组织结构消失,为肿瘤组织所取代,根据有无 R-S 细胞分为霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤;多发性骨髓瘤按国内诊断标准^[9];正常对照组 (control) 11 例,其中正常对照 4 例,良性血友病患者 7

例 (缺铁性贫血 3 例,再生障碍性贫血 4 例),采集标本前已获患者知情同意。

1.1.2 试剂和仪器 包括 Trizol (美国 Invitrogen 公司),焦碳酸二乙酯 (美国 Sigma 公司),BioTeke super RT Ki (北京百泰克公司),2× SYBR Real-time PCR Premixture (北京百泰克公司),琼脂糖粉 (美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 SALL4 引物设计 登陆 Genebank 查出 SALL4cDNA 序列,根据引物设计原则,设计 SALL4 上游引物 5'CATGATGGC TTCCTTAGATGCCCCAG3',下游引物 5'CCGTGTGTTCATGTAG TGAACCTTTAAG3',扩增片段大小为 588bp;内参照 GAPDH 上游引物 5'CCAATATGATTCCACCCATG-3'下游引物 5'GAGAAGGCTGGGGCTCATTT-3',扩增片段大小为 195bp,由北京百泰克公司合成。

1.2.2 细胞基因组 DNA 提取 取骨髓经肝素钠抗凝,PBS 液稀释,加入淋巴细胞分离液,室温下离心,用无菌塑料吸管小心吸取白色环状层液体,移到到新的无菌的锥形离心管。加入 PBS 缓冲溶液,用吸管吹打混匀,室温下离心,洗涤细胞。小心倒掉上清液,用手指轻弹离心管 3~5 下,使白色细胞颗粒群松

动,加入 Trizol,转移至灭菌离心管,-80℃保存备用或立即用于以下实验。

1.2.3 细胞总 RNA 提取及 SALL4mRNA 扩增 向上述步骤所得细胞加入 200μl 氯仿,按试剂说明书中操作步骤提取 RNA。所提取的总 RNA 经紫外分光光度仪测定 260nm 和 280nm 处吸收度 (A),A260/A280 在 1.7-2.0 者用于反转录。逆转录和 PCR 反应试剂盒说明书进行,PCR 扩增产物于 20g/L 琼脂糖凝胶相邻加样孔上电泳,在 GeneGenius 成像系统下观察结果。

1.3 统计学分析 数据处理使用统计软件 SAS9.0 进行统计分析, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。三组及以上 (完全随机设计) 秩和检验使用 kruskal-wallis 法。

2 结果

12 例 ALL 患者中,7 例检测出 SALL4 mRNA,表达量为 0.1055,其中 4 例 T-ALL 均为阴性。12 例 NHL 患者中,8 例检测出 SALL4mRNA,表达量为 0.0965,且阳性表达均为 B 系淋巴瘤,T 系淋巴瘤均未检测出 SALL4mRNA。8 例 MM 患者及 11 例正常对照者个别标本表达 SALL4mRNA 弱阳性,其表达量均为 0.0000。SALL4mRNA 的表达量在组内个体差异存在很大差异,在所有样本中 SALL4mRNA 最大表达量为 0.9900,最小表达量为 0.0000。四组间比较 $\chi^2=24.7, P<0.01$ 。进一步行各组样本的两两比较显示,对照组、MM 组与 ALL 组、NHL 组间存在统计学差异 ($P<0.05$),对照组与 MM 组间无统计学意义 ($P>0.05$); ALL 组及 NHL 组比较均无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 1。

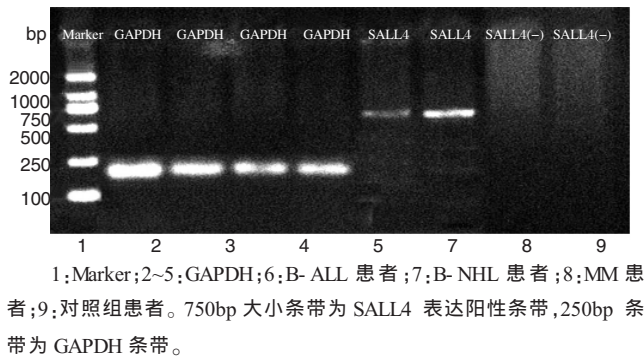


图 1 恶性血液肿瘤患者 SALL4 的表达

3 讨论

SALL 基因是果蝇 Spalt 的同源异型基因,目前包括 SALL1、SALL2、SALL3、SALL4 四位成员,属于 C2H2 型锌指转录因子^[10]。有学者发现^[11],在与 SALL4 突变相关疾病中,少数患者出现血液指标异常的改变,如白细胞增多和血小板减少等表现。近年来研究发现,SALL4 基因是维持胚胎干细胞功能的重要调控基因^[12],使人们开始关注它与恶性血液肿瘤发生的关系。

本研究采用 FQ-PCR 技术对 SALL4 与恶性血液肿瘤发生相关性进行初步研究。结果表明, B-ALL 和 B-NHL 患者骨髓细胞中均可检测到 SALL4mRNA 的表达,T-ALL/NHL 患者骨髓细胞中未检测出正常对照组和 MM 患者骨髓细胞中检测出 SALL4mRNA 水平极低。ALL 和 NHL 患者 SALL4mRNA 表达量分别为 0.1055 和 0.0965,且阳性表达均为 B 系早期来源的白血病/淋巴瘤,T 系淋巴细胞白血病/T 系淋巴瘤均未检测出 SALL4mRNA。提示 SALL4 mRNA 在这两种恶性血液病的发病中均起作用^[13,14]。ALL 患者及 NHL 患者 SALL4mRNA 表达均在 B 系淋巴细胞白血病/淋巴瘤中表达,而在 T-ALL/NHL 未检测

出 SALL4 mRNA,这与国外的报道一致^[15],表明 SALL4 mRNA 可能仅在 B 细胞来源的白血病/淋巴瘤中发挥作用,说明 B 系淋巴瘤与 B 系淋巴细胞白血病可能有共同起源,可能有共同的发病机制,提示 SALL4 与 B 细胞来源的淋巴细胞白血病/淋巴瘤关系密切。而多发性骨髓瘤患者中基本不表达,说明在成熟 B 细胞中不表达 SALL4mRNA,与目前研究显示 SALL4 主要表达在早期细胞,随着细胞分化成熟,SALL4 基因表达减少或消失一致,其表达可能与机体的肿瘤负荷有关^[10,13]。综合上述结果提示,SALL4 在不同恶性血液患者中可能发挥着不同的作用。

参考文献:

- [1] 宋卫亚,牟伟益,宋洁,等. 我市 27 563 例住院恶性肿瘤调查 [J]. 中国医院统计,2006,13(4):346-347.
- [2] 丁丽萍. 某院 3 443 例消化系统恶性肿瘤分类构成分析 [J]. 中国医院统计,2005,13(4):376-377.
- [3] 陈万青,张思维,孔灵芝,等. 中国部分市县 2003 年恶性肿瘤死亡年度报告 [J]. 中国肿瘤,2007,14(8):586-597.
- [4] 张彦红,张万方. 2003~2007 年广州市荔湾区居民恶性肿瘤死因及减寿分析 [J]. 中国慢性病预防与控制,2009,17(1):82-84.
- [5] Hibbs K,Skubitz KM,Pambuccian SE,et al. Differential gene expression in ovarian carcinoma;identification of potential biomarkers [J]. Am J Pathol,2004,163(2):397-414.
- [6] Bhm J,Sustmann C,Wilhelm C,et al. SALL4 is directly activated by TCF/LEF in the canonical Wnt signaling pathway [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2006,348(3):898-907.
- [7] Hoei-Hansen CE,Nielsen JE,Almstrup K,et al. Identification of genes differentially expressed in tests containing carcinoma in situ [J]. Mol Hum Reprod,2004,10(6):423-431.
- [8] Slater EP,Diehl SM,Langer P,et al. Analysis by cDNA microarrays of gene expression patterns of human adrenocortical tumors [J]. Eur J Endocrinol,2006,154(4):587-598.
- [9] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 北京: 科学出版社,2007,232.
- [10] Yang J,Chai L,Liu F,et al. Bmi-1 is a target gene for SALL4 in hematopoietic and leukemic cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2007,104(25):10494-10499.
- [11] Zhang J,Tam WL,Tong GQ,et al. SALL4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1 [J]. Nat cell biol,2006,8(10):1114-1123.
- [12] 杜鹃,崔巍. 婆罗双树样基因 4 与疾病关系的研究进展 [J]. 中华检验医学杂志,2008,31(3):331-333.
- [13] Ma Y,Cui W,Yang J,et al. SALL4,a novel oncogene,is constitutively expressed in human acute myeloid leukemia (AML) and induces AML in transgenic mice [J]. Blood,2006,108(8):2726-2735.
- [14] 王华,谭获,刘芳,等. RT-PCR 检测 SALL4 基因在白血病中的表达 [J]. 临床血液学杂志,2008,21(6):600-602.
- [15] Cui W,Kong NR,Ma Y,et al. Differential expression of the novel oncogene,SALL4,in lymphoma,plasma cell myeloma,and acute lymphoblastic leukemia [J]. Modern Pathology,2006,19(12):1585-1592.