

T-ALL/淋巴瘤中 *BCL11B* 基因转录本的分析

黄欣¹, 李扬秋^{1,2}, 陈思¹, 陈少华¹, 杨力建¹, 卢育洪¹

(暨南大学 1. 医学院血液病研究所; 2. 再生医学教育部重点实验室, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 分析 T-ALL/淋巴瘤中 *BCL11B* 基因转录本的特点。方法: 利用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和实时定量聚合酶链式反应(RQ-PCR)方法分析 12 例 T-ALL/淋巴瘤外周血单个核细胞(PBMC)中 *BCL11B* 基因的表达情况; 限制性内切酶消化确定 PCR 产物的特异性。结果: 3 例 T-ALL/淋巴瘤患者中出现 2 种 *BCL11B* 转录本: 野生型和第 3 外显子缺失型, 其余 9 例均表达第 3 外显子缺失型的转录本。两组病人 PBMC 中 *BCL11B* 表达水平无显著差别($P=0.301$)。结论: 3 例 T-ALL/淋巴瘤病人中存在 2 种 *BCL11B* 基因转录本, 但在表达水平上无明显差别。

[关键词] *BCL11B* 基因; T-ALL/淋巴瘤; 聚合酶链式反应; 实时定量聚合酶链式反应

[中图分类号] R392.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2008)06-0533-05

Analysis of the transcripts of *BCL11B* gene in T-acute lymphoblastic leukemia /lymphoma patients

HUANG Xin¹, LI Yang-qiu^{1,2}, CHEN Si¹, CHEN Shao-hua¹, YANG Li-jian¹, LU Yu-hong¹

(1. Institute of Hematology, Medical College; 2. Key Laboratory for Regenerative Medicine of Ministry of Education, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Aim:** To analyze the transcripts of *BCL11B* gene in T-acute lymphoblastic leukemia / lymphoma patients. **Methods:** RT-PCR and Real-time PCR were performed to detect the expression of *BCL11B* gene in peripheral blood mononuclear cells from 12 T-acute lymphoblastic leukemia / lymphoma patients. Restriction enzyme digestion was performed to determine the specificity of PCR products. **Results:** Three T-ALL / lymphoma patients showed two transcript variants of *BCL11B* gene; the wildtype and the absence of exon 3 transcripts, and the other 9 cases all revealed the absence of exon 3 transcripts. The expression level of *BCL11B* in the 2 groups had no significant difference ($P=0.301$). **Conclusion:** A quarter of T-ALL / lymphoma patients display two transcript variants of the *BCL11B* gene, which might not influence the expression level of *BCL11B* gene.

[Key words] *BCL11B* gene; T-acute lymphoblastic leukemia /lymphoma; polymerase chain reaction; real-time quantitative polymerase chain reaction

B 细胞淋巴瘤/白血病 11B (B-cell lymphoma/leukemia 11B) 基因是近年新发现的 B 细胞淋巴瘤/

白血病 (B-cell lymphoma/leukemia) 家族基因。*BCL11B* 基因表达异常、基因突变及断裂和发生重

[收稿日期] 2008-06-11

[作者简介] 国家自然科学基金项目(30771980); 广东科技计划项目(2007B030703008); 血液病学国务院侨办重点学科建设基金项目

[作者简介] 黄欣(1977-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 白血病免疫分子生物学

通讯作者: 李扬秋, 电话: 020-85226877; E-mail: juyangqiuli@163.com

排与急性淋巴细胞白血病 T 细胞型 (T-acute lymphoblastic leukemia) 发生有一定关系^[1-2],其表达水平在白血病细胞中也有所变化^[1]。T 淋巴细胞白血病/淋巴瘤细胞的生存也与 *BCL11B* 密切相关^[3]。本研究利用普通和实时定量 PCR 对 *BCL11B* 基因在 T-ALL/淋巴瘤中的表达特点进行定性和定量分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本 收集 T-ALL/淋巴瘤共 12 例;其中急性淋巴细胞白血病 T 细胞型 6 例,T 细胞淋巴瘤白血病 5 例,T 淋巴母细胞淋巴瘤 1 例。Jurkat 细胞株和 Molt-4 细胞株作为阳性对照。

1.1.2 主要试剂 RNAzol 试剂盒,随机引物和反转录酶试剂盒均购自 Gibco 公司;PCR2.1TOPO TA 载体购自 Invitrogen 公司;标准品由德国 Greifswald 大学血液肿瘤专科 Schmidt 教授惠赠;Hinf I 限制性内切酶为大连 TaKaRa 公司产品;AmpliTaq Gold 试剂盒购自 Roche 公司。

1.1.3 主要仪器 PCR 扩增仪 (Biometra, 德国);荧光实时定量 PCR 仪 (BIO-RAD, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取和 cDNA 合成 应用 RNAzol 试剂盒提取 RNA 并应用随机引物和反转录酶试剂盒反转录合成 cDNA 第一链,均按常规方法进行。

1.2.2 设计和 *BCL11B*- β_2M 标准品的构建 用于本实验引物和探针见表 1,利用两对引物分别扩增所需的 *BCL11B* 和 β_2M 的基因片段,首先将 β_2M 的基因片段克隆到 PCR2.1TOPO TA 载体上的 T-A 位点上,然后将 *BCL11B* 基因产物克隆到 *EcoRV* 酶切位点上,根据紫外分光光度计和凝胶电泳检测计算 DNA 水平,将标准品 DNA 水平分别调整为每 2 μ L DNA 中含 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 和 10 拷贝等 7 组。

1.2.3 RT-PCR 引物同上设计,由德国柏林 TIB

MOLBIOL 公司合成。总反应体系 25 μ L,含 1 μ L 模板产物 cDNA、1.25 U Taq 聚合酶、0.1 mmol/L dNTP、2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液、1.5 mmol/L $MgCl_2$ 、0.5 μ mol/L 的上下游引物和超纯水。反应在 PCR 扩增仪中进行。反应分别设阳性对照、阴性对照及样品组。反应条件:94 $^{\circ}C$ 1 min(首次 5 min),60 $^{\circ}C$ 1 min,72 $^{\circ}C$ 1 min(末次 6 min),共 40 个循环,最后保存于 4 $^{\circ}C$ 中。PCR 产物于体积分数 2.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳和分析结果。

1.2.4 RT-PCR 产物特异性分析

(1)限制性内切酶消化 Hinf I 限制性内切酶浓度为 4-12 U/ μ L。酶切反应体系:PCR 产物 20 μ L,超纯水 14 μ L,10 \times 酶切缓冲液 4 μ L,Hinf I 酶 2 μ L,总体积 40 μ L,37 $^{\circ}C$ 温育 3 h。酶切完毕后于体积分数 2.5% 琼脂糖凝胶中电泳观察结果。

(2)PCR 产物直接序列分析 20 μ L PCR 产物置入体积分数 2.5% 琼脂糖凝胶中电泳,分离得到只表达第 3 外显子缺失的转录本条带,置入干净的离心管中,并加入 20 μ L 超纯水浸泡,4 $^{\circ}C$ 冰箱过夜,次日取 1 μ L 进行 2 次 PCR,反应体系及条件均同前,产物送上海英骏生物技术公司测序。

1.2.5 定量 PCR 按方法^[1,4]进行,每一标本分别进行 β_2M 和 *BCL11B* 检测。总反应体积为 25 μ L,应用 AmpliTaq Gold 试剂盒,包括 dATP、dCTP 和 dGTP 各 0.1 mmol/L, dUTP 0.2 mmol/L, 0.75 U AmpliTaq Gold 聚合酶,0.25 U 尿嘧啶糖基酶 (UNG),1 \times PCR 缓冲液,4.5 mmol/L $MgCl_2$,以及 0.5 μ mol/L 上游和下游引物,0.1 μ mol/L 的 6FAM-TAMRA 探针和 2 μ L cDNA 或标准品。在 50 $^{\circ}C$ 、2 min,95 $^{\circ}C$ 、5 min 变性后,共进行 45 循环扩增,每一循环包括 95 $^{\circ}C$ 、15 s 和 64 $^{\circ}C$ 、1 min。反应在荧光实时定量 PCR 仪中进行。反应分别设标准组 2 组、阳性对照、阴性对照及样品组。

表 1 应用于实时定量 PCR 的引物和探针序列

引物和探针	序列	作用
<i>BCL11B</i> f	5'-CACCCCGACGAAGATGACCAC	上游引物
<i>BCL11B</i> b	5'-CGGCCCGGGCTCCAGGTAGATG	下游引物
<i>BCL11B</i> p	5'-6FAM-TCACCCACGAAAGGCATCTGTCCCAAGCA-TAMRA	探针
β_2M f	5'-CTCGCGCTACTCTCTCTTTCT	上游引物
β_2M b	5'-TACATGTCTCGATCCCACTTAACTAT	下游引物
β_2M p	5'-6FAM-CTCACGTATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCA-TAMRA	探针

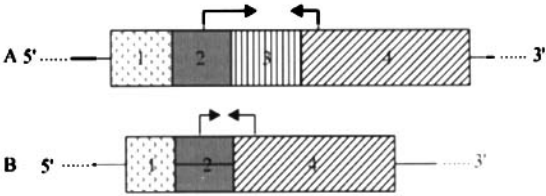
1.2.6 统计学处理 各组样本中*BCL11B*含量以($\bar{x} \pm s$)表示,统计学检验用两两独立样本*t*检验。

2 结果

本实验所设计的*BCL11B*基因上游引物位于基因的624 bp处(位于第2外显子),而下游引物位于*BCL11B*基因序列的1 029 bp处(位于第4外显子),根据*BCL11B*的cDNA序列,做扩增的片段应为406 bp,但是所扩增PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分析发现全部12例样本均存在1条200 bp左右电泳带,经序列分析发现为缺失第3外显子的*BCL11B*基因转录本,PCR产物为193 bp(图1-3)。而仅有3例病人样本的PCR产物可发现除了193 bp电泳带之外,还出现406 bp的与预期结果一致的PCR产物,由于受小片段193 bp PCR产物的竞争性扩增影响,该产物扩增效应较差,同时在406 bp附近还存在一380 bp大小的产物(未明确)(图4)。经过限制性内切酶Hinf I酶(酶切位点为:G⁻ANTC⁺,位于第3外显子,基因的852 bp处)消化后,406 bp产物可被切为229 bp和177 bp两个片段(图5),而193 bp和380 bp大小的产物无明显变化。

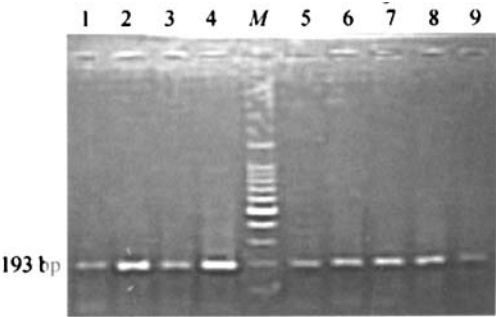
Jurkat细胞株和Molt-4细胞株PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分析均同时出现193 bp和406 bp电泳带,并且在406 bp附近也存在一380 bp大小的产物,

未明确。



A:野生型转录本;B:第3外显子缺失转录本。前头为所设计引物所在位置,上游引物位于第2外显子,下游引物位于第4外显子,所扩增的PCR产物在野生型转录本为406 bp,在第3外显子缺失转录本为193 bp

图1 *BCL11B*基因两种转录本示意图



全部产物均为193 bp,M:DNA分子质量标准,1~9:T-ALL/淋巴瘤样本(第3外显子缺少转录本)

图2 PCR产物琼脂糖凝胶电泳分析结果

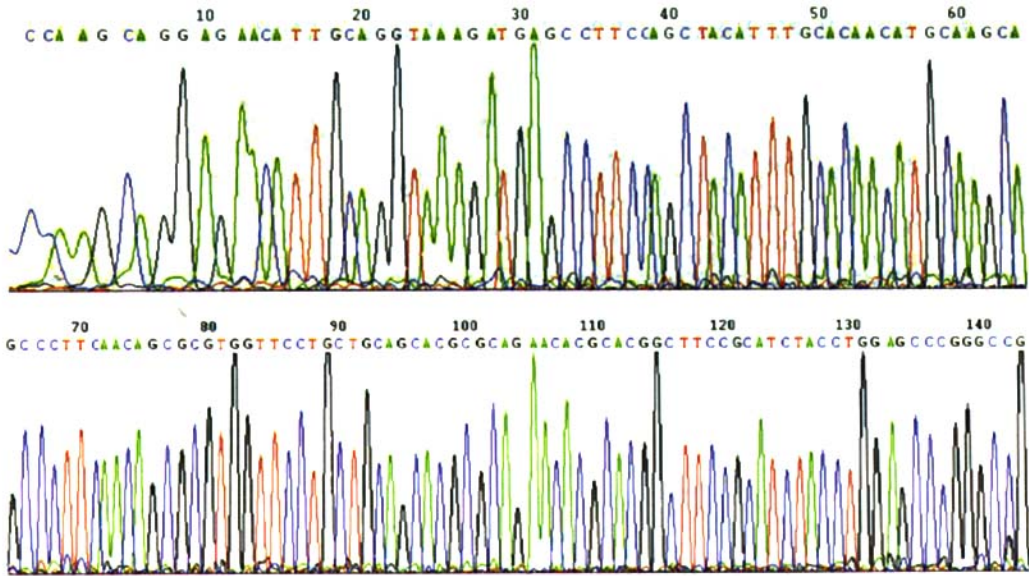
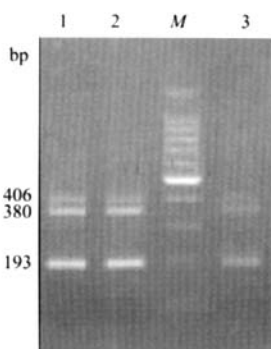
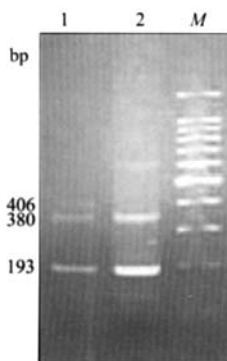


图3 第3外显子缺失转录本序列分析图(部分)



M: DNA 分子质量标准, 3 例 T-ALL/淋巴瘤样本存在 193 bp 和 406 bp 产物(1~3; P10~P12)

图 4 两种转录本 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析结果



1: 酶切前 PCR 产物; 2: 酶切产物; M: DNA 分子质量标准

图 5 PCR 产物限制性内切酶消化电泳图

根据所检测样本中的 β_2M 拷贝数, 计算 100 000 个 β_2M 拷贝中所含 *BCL11B* 拷贝数。计算公式为: $n = 100\,000 \times BCL11B / \beta_2M^{[5]}$ 。12 例 T-ALL/淋巴瘤患者 *BCL11B* 基因的表达水平为 (140.28 ± 205.29) 拷贝/ $10^5 \beta_2M$ 拷贝, 其中 3 例出现两种 *BCL11B* 转录本的样本 (347.47 ± 347.08) 拷贝/ $10^5 \beta_2M$ 拷贝) 和其余 9 例仅含一种第 3 外显子缺失转录本的样本 (71.21 ± 79.78) 拷贝/ $10^5 \beta_2M$ 拷贝), 经比较无统计学差异 ($P = 0.301$)。

3 讨论

BCL11B 基因定位于 14 号染色体长臂 14q32.31 位点, 全长 7 816 bp, 含 4 个外显子。其编码一种锌指蛋白, 表达于 T 细胞、胸腺细胞和脑组织中。*BCL11B* 缺失动物胸腺中 $CD_4^- CD_8^-$ 双阴性细胞发育受阻, 不能发生 TCR $V\beta 2D\beta$ 基因重排, 细胞表面也缺乏 pre-TCR 复合物^[1,5]。故 *BCL11B* 是胸腺细胞发育和 T 细胞分化和存活所必需的基因之一, 同

时, 在保持 T 细胞动态平衡中也非常重要^[6]。不同时期的 T 细胞中 *BCL11B* 的表达水平有所不同, T 细胞活化时其表达水平发生变化, 在一些 T 细胞肿瘤中呈超表达状态^[7]。本实验室前期研究也提示 *BCL11B* 基因与 T-ALL 有一定的关系, *BCL11B* 基因缺失可影响 T 细胞分化和存活, 而 *BCL11B* 过度表达可能与 T 细胞异常增殖有关^[5]。

本研究利用普通和实时定量 PCR 对 *BCL11B* 基因在 T-ALL/淋巴瘤中的表达特点进行定性和定量分析。经 RT-PCR 产物特异性分析, 发现 3 例 T-ALL/淋巴瘤患者同时出现两种 *BCL11B* 转录本 (野生型和第 3 外显子缺失), 其余 9 例均只表达第 3 外显子缺失的转录本, 但目前未发现只表达含第 3 外显子的转录本。因此, 从以上 12 例 T-ALL/淋巴瘤患者均表达第 3 外显子缺失的转录本, 提示 *BCL11B* 基因中出现了第 3 外显子选择的 mRNA 变位剪接。研究发现有 70%~80% 的选择性剪接改变了蛋白的功能^[8-9], 而且不同的剪接体常参与多种信号传导、转录因子的表达、个体分化发育和细胞凋亡、兴奋、收缩等关键的生理过程, 因此选择性剪接与胚胎发育、人类许多系统的疾病、肿瘤等密切相关。目前, *BCL11B* 基因被认为是一种肿瘤抑制基因, 其基因片段缺失可使该基因失活、转录异常, 使基因的正常生物学功能丧失从而导致肿瘤发生。如有研究显示 1 例 inv(14)(q11.2 q32.31) 的 T-ALL, *BCL11B* 基因在第 3 外显子中的断裂引起了 *BCL11B* 与 TCR δ 基因的 D3 区发生融合, 产生了融合基因产物, 而失去了野生型 *BCL11B* 的表达^[1]。而第 3 外显子缺失的选择性剪接是否改变了蛋白的功能, 是否使 *BCL11B* 基因的正常生物学功能丧失从而导致肿瘤发生尚需进一步深入研究。

虽然 3 例样本同时表达两种转录本, 但在表达量上与仅表达一种转录本的样本无明显统计学差别。可能两种转录本中起主要作用的是所有样本中均有表达的第三外显子缺失的转录本。本研究中还发现在 406 bp 残基 PCR 产物电泳带附近还存在一 380 bp 大小的产物, 经提高退火温度 (64 $^{\circ}\text{C}$, 68 $^{\circ}\text{C}$) 再次 PCR 或 Hinf I 酶酶切均未能使其消失, 当提高退火温度至 70 $^{\circ}\text{C}$ 时, 406 bp 和 380 bp 残基 PCR 产物同时消失。目前认为 380 bp 与 406 bp 残基 PCR 产物具有相关性, 但 380 bp 残基 PCR 产物未能被

Hinf I 酶切消化,其序列中可能存在 Hinf I 酶切位点的缺失或突变,是否为非特异性产物尚待进一步研究证实。

本研究初步分析了 *BCL11B* 基因在 T-ALL/淋巴瘤中有两种转录本的表达特点,同时用实时定量 PCR 检测方法对表达 *BCL11B* 基因不同转录本的样本进行定量分析,结果表明两种转录本同时出现可能不会对其表达量有显著的影响。

[参考文献]

- [1] PRZYBYLSKI G K, DIK W A, WANZECK J, et al. Disruption of the *BCL11B* gene through inv (14) (q11.2q32.31) results in the expression of *BCL11B* TRDC fusion transcripts and is associated with the absence of wild-type *BCL11B* transcripts in T-ALL [J]. *Leukemia*, 2005, 19(2): 201-208.
- [2] BEZROOKOVE V, VAN ZELDEREN BHOLA S L, BRINK A, et al. A novel t (6;14) (q252q27;q32) in acute myelocytic leukemia involves the *BCL11B* gene [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004, 149(1): 72-76.
- [3] GRABARCZYK P, PRZYBYLSKI G K, DEPKE M, et al. Inhibition of *BCL11B* expression leads to apoptosis of malignant but not normal mature T cells. *Oncogene*, 2007, (26): 3797-3810.
- [4] 李扬秋, 杨力建, 陈少华, 等. 实时荧光定量 PCR 分析脐血 T 细胞亚群中 TRECs 水平 [J]. *免疫学杂志*, 2004, 20(5): 407-409.
- [5] 李扬秋, 陈少华, 杨力建, 等. 实时定量 PCR 检测白血病中 *BCL11B* 基因的表达水平 [J]. *免疫学杂志*, 2006, 22(4): 464.
- [6] WAKABAYASHI Y, WATANABE H, INOUE J, et al. *BCL11B* is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(6): 533-539.
- [7] PRZYBYLSKI G K, DIK W A, WANZECK J, et al. Disruption of the *BCL11B* gene through inv (14) (q11.2q32.31) results in the expression of *BCL11B* TRDC fusion transcripts and is associated with the absence of wild-type *BCL11B* transcripts in T-ALL [J]. *Leukemia*, 2005, 19(2): 201.
- [8] KAN Z, ROUCHKA E C, GISH W R, et al. Gene structure prediction and alternative splicing analysis using genomically aligned ESTs. [J]. *Genome Res*, 2001, 11(5): 889-900.
- [9] MODREK B, RESCH A, GRASSO C, et al. Genome wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(13): 2850-2859.

[责任编辑:朱颖娜]