

Elf-1 基因在急性髓细胞性白血病中的表达情况

沈琦¹, 郑海涛¹, 陈少华¹, 杨力建¹, 李扬秋^{1,2}

(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: 建立实时定量 PCR 检测 *Elf-1* 基因表达水平的方法, 了解急性髓细胞性白血病(AML)患者外周血 *Elf-1* 基因表达水平。方法: 采用 SYBR Green I 荧光定量 PCR 和相对定量分析法检测 33 例 AML 患者: M2 型 17 例、M3 型 6 例、M5 型 10 例和 20 例健康人外周血的单核细胞的 *Elf-1* 表达情况, 以 $\beta 2$ 微球蛋白基因($\beta 2M$)作为内参, 采用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t} \times 100\%$ 计算 *Elf-1* 基因表达水平。结果: AML 组 *Elf-1* 表达水平($13.518 \pm 19.197\%$)明显高于健康对照组($2.044 \pm 1.321\%$) ($P < 0.01$), 不同 AML 亚型之间 *Elf-1* 的表达水平没有显著性差异 ($P = 0.52$), 但各亚型 AML 的 *Elf-1* 的表达水平均与健康对照组比较均有显著性差异 ($P < 0.01$)。结论: 建立 SYBR Green I 荧光实时定量 PCR 分析外周血 *Elf-1* 表达水平的方法, 检测急性髓细胞性白血病 *Elf-1* 基因高表达情况。

[关键词] *Elf-1* 基因; 实时定量 PCR; 急性髓细胞性白血病(AML); T 细胞免疫缺陷; TCR ζ 链

[中图分类号] R733.71; R392.11 [文献标志码] A [文章编号] 1000-9965(2009)06-0581-04

The feature of *Elf-1* gene expression in acute myeloid leukemia

SHEN Qi¹, ZHENG Hai-tao¹, CHEN Shao-hua¹, YANG Li-jian¹, LI Yang-qiu^{1,2}

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

[Abstract] Aim: To establish a real-time PCR technique for detection and quantify of *Elf-1* gene expression and to investigate the expression level of *Elf-1* gene in patients with acute myeloid leukemia (AML). Methods: Real-time PCR with SYBR Green I technique was used for detecting *Elf-1* expression level in peripheral blood mononuclear cells of 33 patients with AML (including 17 cases with M2, 6 cases with M3, 10 cases with M5 and 20 healthy individuals). $\beta 2$ -microglobulin gene ($\beta 2M$) was used as an endogenous reference. Relative changes in *Elf-1* expression level were used by the $2^{-\Delta\Delta C_t} \times 100\%$ method. Results: The expression level of *Elf-1* in 33 cases with AML ($13.518 \pm 19.197\%$) was significant higher than those in the healthy control ($2.044 \pm 1.321\%$) ($P < 0.01$). The expression level of *Elf-1* had not significant difference among the three subtypes ($P = 0.52$). However, by comparing with the healthy control, the expression level of *Elf-1* had significant difference in all of three subtypes ($P < 0.01$). Conclusion: The SYBR Green I real-time technique for quantitative detection of *Elf-1* expression levels was established. And the overexpression of *Elf-1* gene in AML was detected.

[Key words] *Elf-1* gene; real-time PCR; acute myeloid leukemia(AML); T-cells immunodeficiency; TCR ζ chain

[收稿日期] 2009-06-22

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30871091)

[作者简介] 沈琦(1984-), 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, 女, 研究员, 博士生导师, Tel: 020-85226877; E-mail: jnyangqiuli@163.com

Elf-1 (E74-like factor 1) 是 Ets 转录因子家族中的一员,参与细胞和器官的发生过程、细胞有丝分裂原的激活、癌发生以及病毒基因激活等。已有报道 *Elf-1* 在自身免疫系统疾病及多种实体肿瘤中过度表达,且与 TCR ζ 链的异常表达有关^[1-3]。本研究组在前期研究急性髓细胞性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 患者中 TCR ζ 链异常表达的基础上^[4],进一步分析 *Elf-1* 在 AML 中的表达水平,以期了解 AML 患者 T 细胞免疫缺陷的一些相关变化特点。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 标本 经细胞形态学、细胞化学和免疫学确诊的 AML 患者 33 例,包括 M2 型 17 例、M3 型 6 例、M5 型 10 例;其中男 17 例、女 16 例,年龄 6~76 岁,中位年龄 36 岁。收集肝素抗凝外周血标本,以淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞。同时,20 例健康人外周血样本作为对照,其中男 9 例、女 11 例,年龄 25~73 岁,中位年龄 35 岁。

(2) 主要试剂 TRIzol 试剂盒购自 Invitrogen 公司,反转录酶试剂盒 PowerScript™ Reverse 购自 BD 公司,Real Master Mix 试剂盒购自 Tiangen 公司。

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

1.2 方法

(1) RNA 提取及 cDNA 合成 应用 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen, 美国) 按常规方法提取 RNA。然后应用随机引物和反转录酶试剂盒 (PowerScript™ Reverse, BD, 美国) 合成 cDNA 第 1 链,均按常规方法进行。经 $\beta 2$ 微球蛋白基因 ($\beta 2M$) 的 RT-PCR 确定所合成 cDNA 的质量。

(2) 引物设计 从 *Elf-1* 基因序列中设计引物 (ACCESSION No. 001145353), *Elf-1* 上游引物: 5'-ACAAAGATGGAAAGGGAAACA-3' (80~100 bp), 下游引物: 5'-CCACAACCTGGACACTGCT-3' (231~213 bp), 扩增目的片段长度 152 bp。 $\beta 2M$ 上游引物: 5'-CAGCAAGGACTGGTCTTTCTAT-3', 下游引物: 5'-GCGGCATCTTCAAACCTC-3', 扩增目的片段长度 162 bp, 引物由上海英骏公司 (Invitrogen, Shanghai) 合成。

(3) 扩增效率一致性检测 检测样本 *Elf-1* 基因表达情况之前,根据相对定量法分析的原则,首先必须保证 *Elf-1* 基因和看家基因 $\beta 2M$ 的扩增效率的一致。故将 Molt-3 细胞株的 cDNA 以 5 倍倍比稀

释,并以此做为模板,进行 SYBR Green I 实时定量 PCR 来检测其扩增效率是否一致。

(4) SYBR Green I 实时定量 PCR 利用 SYBR Green I 染料检测各样本 *Elf-1* 基因表达情况,并将 $\beta 2M$ 基因作为内参照。每 1 标本分别进行 *Elf-1* 和 $\beta 2M$ 检测。总反应体积为 20 μ L,应用 Real Master Mix 试剂盒 (Tiangen, 北京),包括 2.5 倍 Real Master Mix 9 μ L、浓度为 0.5 mmol/L 上、下游引物以及 1 μ L cDNA。在 95 $^{\circ}$ C、2 min 变性后,共进行 45 个循环扩增,循环包括 95 $^{\circ}$ C、20 s, 62 $^{\circ}$ C、40 s, 79 $^{\circ}$ C、1 s。并在 79 $^{\circ}$ C 和 81 $^{\circ}$ C 两次读板 (1 s)。随后,以 0.17 $^{\circ}$ C/s 变化速度从 55 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C 每隔 2 s 记录 1 次荧光值,获得熔解曲线。反应在 Chromo 4 荧光定量 PCR 仪 (BIO-RAD, USA) 中进行;每样本均重复检测两次。

(5) PCR 产物分析 将所扩增的 PCR 产物熔解曲线分析,同时随机进行体积分数为 2% 琼脂糖凝胶电泳,以确定产物是否为所扩增的目的片段,部分 PCR 产物进行核苷酸序列分析,并与基因库所报道的 *Elf-1* cDNA 序列进行比对。

(6) *Elf-1* 的相对定量分析 采用相对定量法分别分析 AML 患者和健康人 *Elf-1* 基因相对 mRNA 的表达水平,以 $\beta 2M$ 为内参照,利用 C_t 值,计算 AML 患者和健康人 *Elf-1* 基因相对 mRNA 表达量,其计算公式为^[5]: 相对 mRNA 表达量 = $2^{-\Delta C_t} \times 100\%$, 其中, $\Delta C_t = C_t(Elf-1) - C_t(\beta 2M)$ 。

1.3 统计学分析

利用 SPSS 16.0 进行 Mann-Whitney U Test 分析、Kruskal-Wallis H test 分析和 AML 患者 *Elf-1* 基因表达情况与年龄的相关性分析。

2 结果

2.1 实时荧光定量 RT-PCR 比较 C_t 法的建立

(1) 实时定量 RT-PCR 方法的建立 为了建立实时荧光定量 RT-PCR 合适的反应条件,本研究采用 Molt-3 细胞株的 cDNA 倍比稀释后分别进行目的基因和参照基因的扩增,制作相对标准曲线,目的基因 *Elf-1* 和参照基因 $\beta 2M$ 的相对标准曲线都显示出良好的 C_t 值与起始模板各稀释量的对数的直线相关关系,相关系数 R^2 分别为:0.998、0.998。

(2) 扩增效率一致性分析 为了利用相对定量的比较 C_t 法对 *Elf-1* mRNA 表达进行定量,将倍比稀释的 cDNA 的 log 值作为横坐标, $\Delta C_t = (C_{t_{Elf-1}} - C_{t_{\beta 2M}})$ 作为纵坐标绘制关系曲线,得出 *Elf-1* 与内参照之间的直线斜率的绝对值为 0.066,直线斜率的绝

对值接近于 $0^{[6]}$,表明目的基因 *Elf-1* 和参照基因 $\beta 2M$ 的扩增效率一致,实验结果可以应用公式 $2^{-\Delta Ct} \times 100\%$ 进行相对定量。

2.2 PCR 产物的确定分析

取自 AML 患者和健康人标本, $\beta 2M$ 产物的溶解曲线峰值均在 83°C , *Elf-1* 产物的溶解曲线峰值在

82°C ,并经随机标本的 *Elf-1* 体积分数为 2% 琼脂糖凝胶电泳分析显示 PCR 产物片段大小正确,为 152 bp (图 1,2)。随机取 1 例健康人和 2 例 AML 病人 PCR 产物直接序列分析结果与 *Elf-1* 基因序列 (No. 001145353) 完全一致。

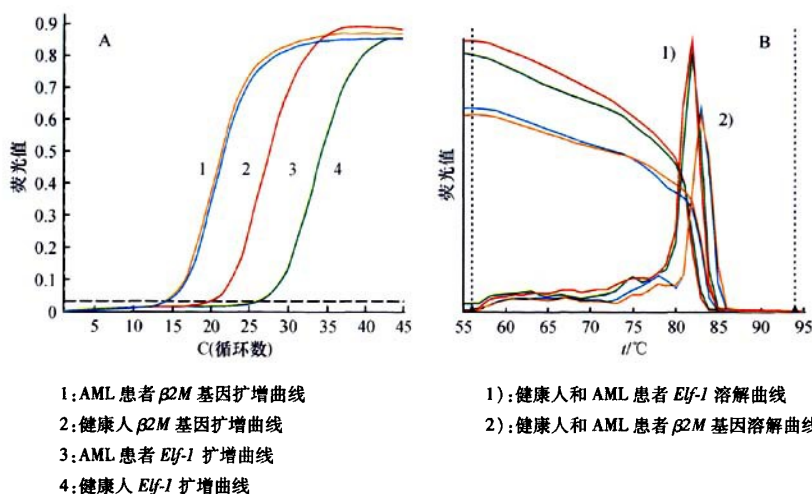
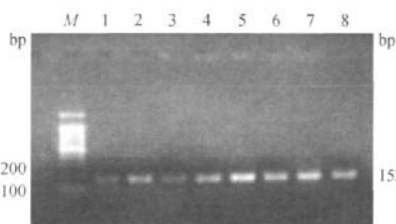


图1 *Elf-1* 和 $\beta 2M$ 基因实时扩增曲线(A)和溶解曲线图(B)



全部产物均为 152 bp, M: DNA 分子质量标准, 1~4: 健康人标本, 5~8: AML 患者

图2 *Elf-1* 基因的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析结果

2.3 *Elf-1* 在急性髓细胞性白血病患者中的相对表达量

采用公式 $2^{-\Delta Ct} \times 100\%$ 计算 20 例健康人 (2.044 ± 1.321)% 及 33 例 AML 患者 (13.518 ± 19.197)% 外周血 *Elf-1* 的表达水平, 结果显示: 与健康人表达量 (平均秩 = 14.40) 相比, 33 例 AML 患者的表达量增高 (平均秩 = 34.64), 两者比较有统计学差异 ($P < 0.01$)。将 AML 分型比较, 结果显示: 与健康人相比, 17 例 M2 型 (16.118 ± 18.246)% (平均秩 = 35.53)、6 例 M3 型 (4.538 ± 4.552)% (平均秩 = 30.40)、10 例 M5 型 (14.458 ± 25.287)% (平均秩

= 34.60) 患者外周血表达量均增高, 有统计学差异 ($P < 0.01$)。而 3 种亚型之间 *Elf-1* 的表达水平无统计学差异 ($P = 0.52$, 图 3)。

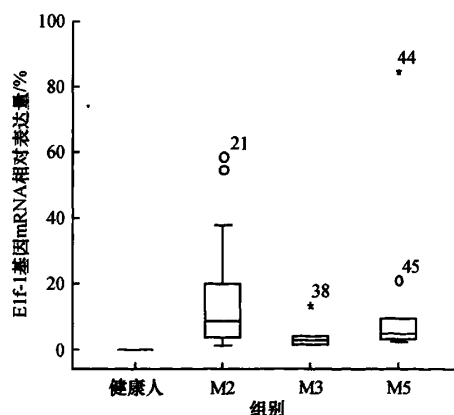


图3 各 AML 亚型和健康人 *Elf-1* 基因 mRNA 相对表达量

2.4 *Elf-1* 表达情况与年龄的相关性分析

利用 SPSS 16.0 进行 *Elf-1* 表达情况与年龄的相关性分析结果显示, 健康人及 AML 患者 *Elf-1* 表达情况与年龄均无直线相关关系 ($P = 0.419$, $P = 0.703$)。

3 讨论

肿瘤尤其是血液肿瘤病人存在明显的T细胞免疫缺陷状态,T细胞免疫缺陷包括了T细胞增殖潜能即胸腺近期输出功能降低、T细胞谱系缺失以及T细胞活化信号通路分子的表达异常等,多种白血病中TCR信号分子TCR ζ 表达降低或缺失^[4,7]。

本研究利用实时定量PCR方法检测AML患者中*Elf-1*基因的表达水平。结果显示AML患者*Elf-1*基因的表达量较健康人有明显升高,但不同亚型AML患者*Elf-1*基因的表达量上升水平接近,提示不同类型AML中*Elf-1*具有相似的表达特点,*Elf-1*高表达可能是AML细胞的一种共同特点。

*Elf-1*定位于13号染色体13q13,主要表达于造血细胞和成纤维细胞等,调节诱导多种基因的表达,包括CD4、GM-CSF和TCR ζ 等。*Elf-1*蛋白为一种与细胞增殖相关的核蛋白,在T细胞核中结合于TCR ζ 基因的启动子并激活启动转录,故*Elf-1*是T淋巴细胞特异性转录因子^[8]。当TCR ζ 表达减少的时候,通常FcR γ 链的表达量表现为上调。*Elf-1*能结合到FcR γ 链编码基因上游启动子200 bp内的富集GGAA保守区域,对FcR γ 链的表达呈抑制效果,过度表达*Elf-1*能抑制FcR γ 链的表达水平^[9]。本研究组前期研究已表明,AML患者TCR ζ 链表达下调或缺失^[4,7],而本研究发现调节TCR ζ 基因的上游分子*Elf-1*基因则呈高表达状态,提示可能是机体一种反馈性上调表达的情况,而其相关关系有待研究。另外,*Elf-1*经常和其他分子(如转录因子Sp1和GABP)组成一个复合体来执行它的功能,因此,深入分析其在AML中T细胞信号通路缺陷中可能的作为,仍需要进一步分析其相关的基因等^[10]。

本研究建立了*Elf-1*定量检测方法,初步分析了*Elf-1*基因在AML患者中的表达特点,高表达水平的*Elf-1*基因可能是AML中T细胞信号通路异常的一个相关因素,*Elf-1*基因的表达量上升水平与疾病的发生、发展及疾病的转归是否存在内在联系或与疾病的恶性程度之间的关系,尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] JUANG Y T, TENBROCK K, NAMBIAR M P, et al. Defective production of functional 98-kDa form of Elf-1 is responsible for the decreased expression of TCR zeta-chain in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Immunol, 2002, 169(10): 6048-6055.
- [2] TAKAI N, MIYAZAKI T, NISHIDA M, et al. The significance of Elf-1 expression in epithelial ovarian carcinoma[J]. Int J Mol Med, 2003, 12(3): 349-354.
- [3] TAKAI N, MIYAZAKI T, NISHIDA M, et al. Clinical relevance of Elf-1 overexpression in endometrial carcinoma[J]. Gynec Onc, 2003, 89(3): 408-413.
- [4] 陈思,李扬秋,陈少华,等. 急性髓细胞白血病人TCR ζ 链基因表达特点[J]. 循证医学, 2007, 7(1): 54-57.
- [5] STAMS W A G, den BOER M L, BEVERLOO H B, et al. Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21)+ pediatric ALL[J]. Blood, 2003, 101(7): 2743-2747.
- [6] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta Ct$} Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [7] 李扬秋,林晨,李蓓. T细胞受体的研究和应用[M]//陈思,李扬秋. TCR ζ 基因分析的意义和应用. 北京:人民卫生出版社,2009:183-185.
- [8] RELAHAN B L, JENSEN J P, HOWCROFT T K, et al. Elf-1 regulates basal expression from the T cell antigen receptor ζ -chain gene promoter[J]. Immunol, 1998, 160(6): 2794-2801.
- [9] JUANG Y T, SUMIBICAY L, TOLNAY M, et al. Elf-1 binds to GGAA elements on the FcR γ promoter and represses its expression[J]. Immunol, 2007, 179(7): 4884-4889.
- [10] TAKAHASHI K, HAYASHI N, SHIMOKAWA T. Cooperative regulation of Fc receptor gamma-chain gene expression by multiple transcription factors, including Sp1, GABP, and Elf-1[J]. Biol Chem, 2008, 283(22): 15134-15141.

[责任编辑:朱颖娜]