**分类号：320.2430** **学校代码：10114**

**密级：** 学 **号：Dr2009022**

**MDM4S 在急性髓系白血病中的表达及其在复杂核型**

**形成中的作用**

**Expression of MDM4S in Acute Myeloid Leukemia and its Contribution to Complex Karyotype Formation**

**研 究 生 ： 李 莉**

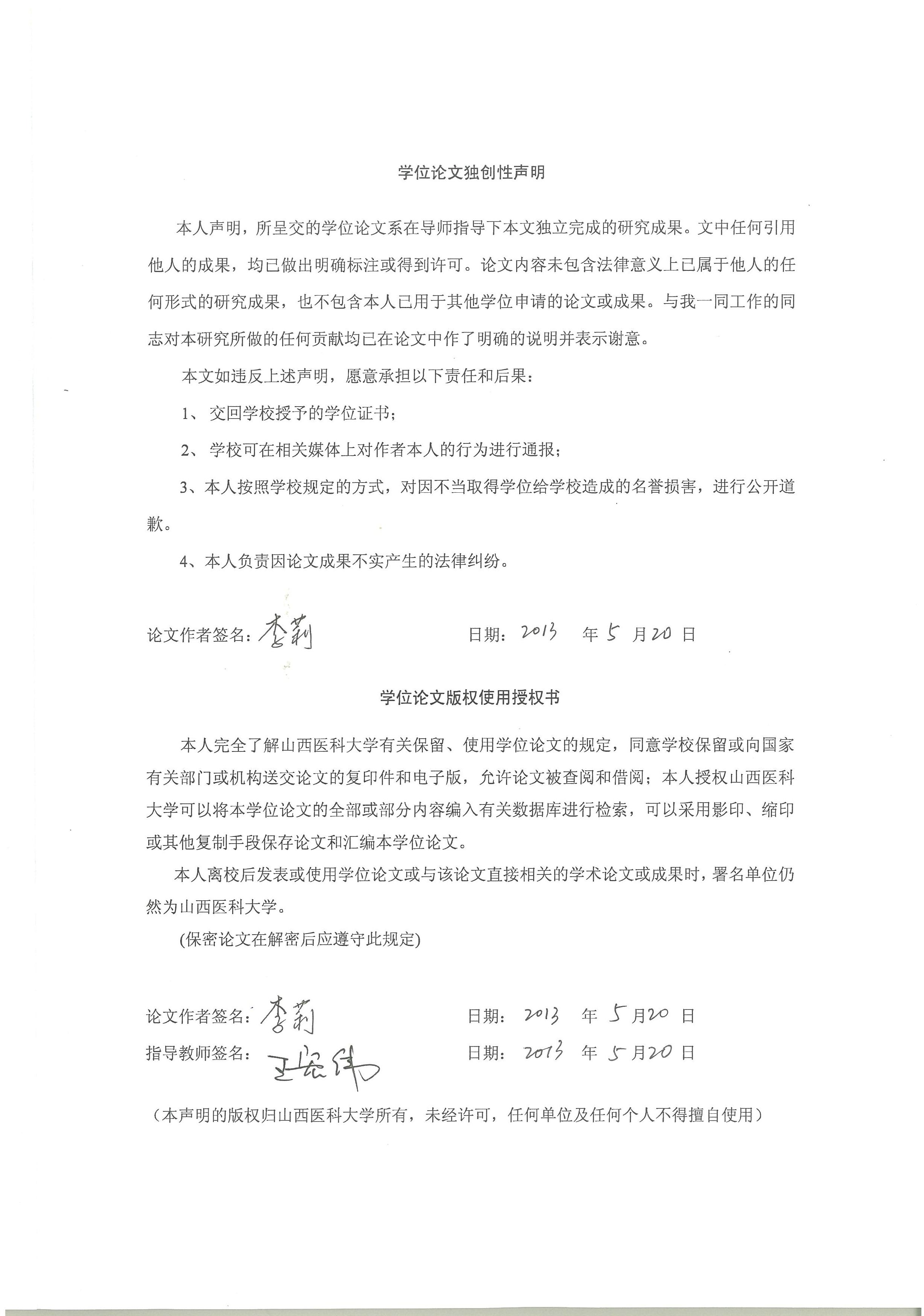
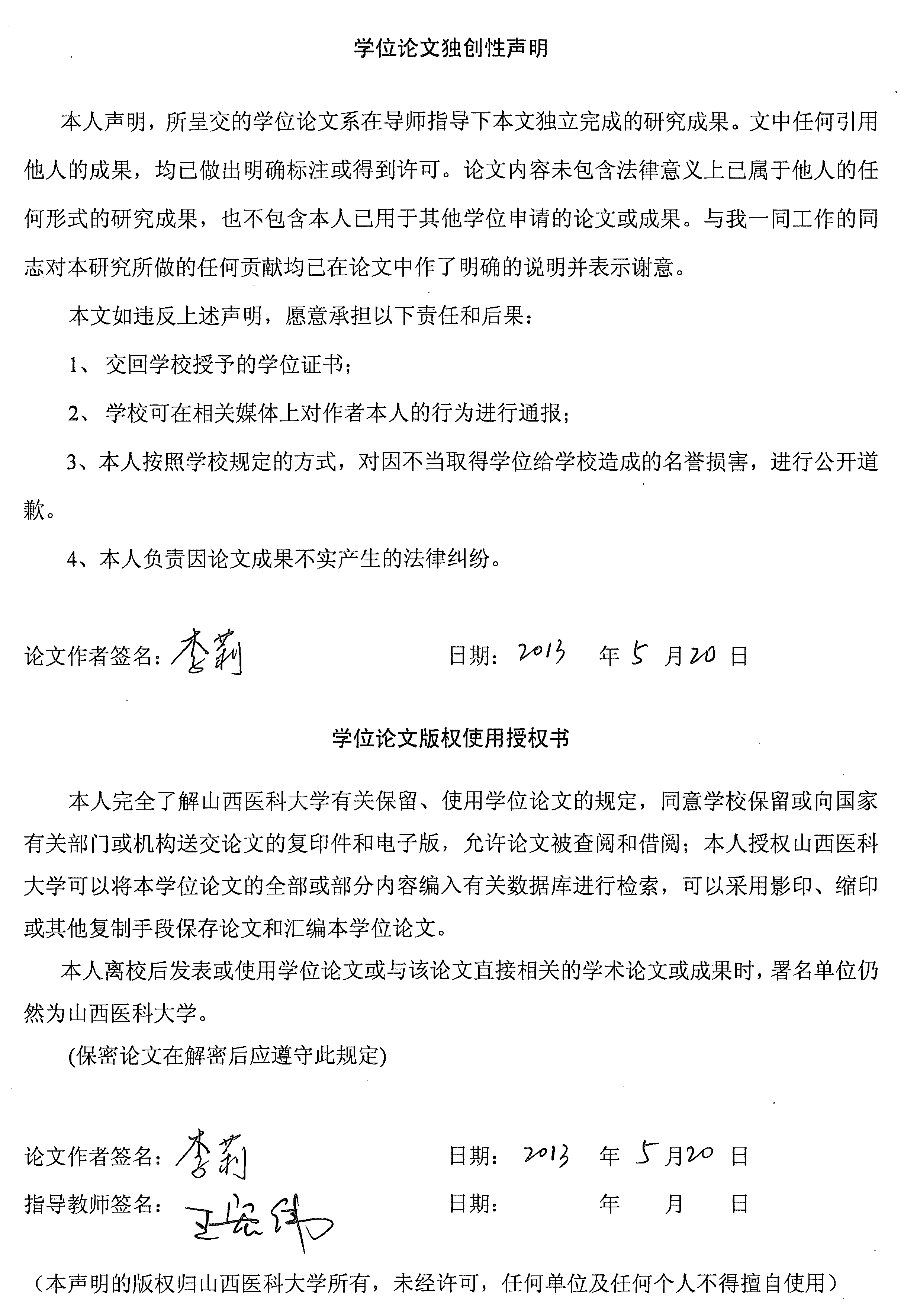
**指 导 教 师 ： 王 宏 伟** 教 **授专 业 名 称 ： 内 科 学**

**研 究 方 向 ： 血 液 病 分 子 生 物 学**

**所 在 学 院 ： ft 西 医 科 大 学 第 二 临 床 医 学 院**

**中国 ft西**

**二〇一三 年 五 月 二十 日**



目 录

[摘 要](#_Toc6861626) 2

**[1.](#_Toc6861627)** [在](#_Toc6861627)**[140](#_Toc6861627)**[例初发](#_Toc6861627)**[AML](#_Toc6861627)**[患者中筛选出](#_Toc6861627)**[15](#_Toc6861627)**[例复杂核型患者](#_Toc6861627) 3

**[2.](#_Toc6861628)** [初发急性髓系白血病相关基因突变及](#_Toc6861628)***[MDM4-S](#_Toc6861628)*[/](#_Toc6861628)*[MDM4-FL](#_Toc6861628)***[表达分析](#_Toc6861628) 3

**[3](#_Toc6861629)**[.](#_Toc6861629)***[MDM](#_Toc6861629)*[2](#_Toc6861629)**[、](#_Toc6861629)***[MDM](#_Toc6861629)*[4](#_Toc6861629)*[-S](#_Toc6861629)***[基因慢病毒表达载体的构建与感染](#_Toc6861629) 3

**[4.](#_Toc6861630)** [细胞周期及细胞增殖实验](#_Toc6861630) 4

**[5.](#_Toc6861631)****[Real-time RT-PCR](#_Toc6861631)** 4

**[6.](#_Toc6861632)****[western-blot](#_Toc6861632)**[检测](#_Toc6861632) 4

[结 论](#_Toc6861633) 4

**[ABSTRACT](#_Toc6861634)** 4

**[1.](#_Toc6861635)****[15 CK-AML patients were identified from 140](#_Toc6861635) *[de novo](#_Toc6861635)* [AML patients](#_Toc6861635)** 5

**[2.](#_Toc6861636)****[Gene mutation and expression of](#_Toc6861636) *[de novo](#_Toc6861636)* [AML](#_Toc6861636)** 5

**[3](#_Toc6861637)**[.](#_Toc6861637)**[To construct lentiviral expression vectors of](#_Toc6861637) *[MDM2](#_Toc6861637)*[,](#_Toc6861637) *[MDM4S](#_Toc6861637)* [and infect HepG2](#_Toc6861637)** 5

**[4.](#_Toc6861638)****[cell cycle and cell proliferation assay](#_Toc6861638)** 6

**[5.](#_Toc6861639)****[Real-time RT-PCR](#_Toc6861639)** 6

**[6.](#_Toc6861640)****[western-blot](#_Toc6861640)** 6

[前 言](#_Toc6861641) 6

[前 言](#_Toc6861642) 10

**[1.](#_Toc6861643)** [研究对象和主要仪器试剂](#_Toc6861643) 11

**[2.](#_Toc6861644)** [实验方法和步骤](#_Toc6861644) 11

**[3.](#_Toc6861645)** [实时定量](#_Toc6861645)**[RT-PCR](#_Toc6861645)**[检测](#_Toc6861645)***[MDM2](#_Toc6861645)***[、](#_Toc6861645)***[MDM4-FL](#_Toc6861645)***[和](#_Toc6861645)***[MDM4-S](#_Toc6861645)***[的表达量](#_Toc6861645) 19

[前言](#_Toc6861646) 21

**[1.](#_Toc6861647)** [实验材料](#_Toc6861647) 21

**[2.](#_Toc6861648)** [实验方法](#_Toc6861648) 22

[前言](#_Toc6861649) 26

**[2.](#_Toc6861650)** [实验方法](#_Toc6861650) 29

**[5.](#_Toc6861651)****[Western-blot](#_Toc6861651)**[检测](#_Toc6861651)**[P53](#_Toc6861651)**[、](#_Toc6861651)**[P21](#_Toc6861651)**[及纺锤体检查点相关蛋白表达](#_Toc6861651) 34

[结论](#_Toc6861652) 36

[参 考 文 献](#_Toc6861653) 36

[摘 要](#_Toc6861654) 37

[3. CK-AML的预后](#_Toc6861655) 38

[4. 复杂核型形成的机制](#_Toc6861656) 38

[参 考 文 献](#_Toc6861657) 39

MDM4S在急性髓系白血病中的表达及其在复杂核型形成中的作用

摘 要

目的

伴复杂核型急性髓系白血病（acute myeloid leukemia with complex karyotype, CK-AML）大约占成人AML的10%～15%，并且随着年龄的增长，发生率增加。复杂核型是AML独立的预后不良因素，临床化疗缓解率低，预后差，缺乏有效的化疗方案。研究复杂核型形成机制有望找到有效的治疗靶点，改善患者预后。本研究通过核型分析筛选初发急性髓系白血病伴复杂核型患者，从P53抑制因子鼠双微体基因4（mouse double minute 4, MDM4）及其短剪接体(short isoform of MDM4, MDM4-S)与复杂核型形成关系入手，检测CK-AML与正常核型AML患者*MDM*4及*MDM*4-S的表达水平，并构建MDM4S慢病毒载体，感染表达野生型P53的HepG2细胞株，观察细胞周期、细胞增殖、P53通路相关蛋白和纺锤体检查点相关蛋白表达的变化，从而在细胞和分子水平探讨复杂核型形成的可能机制。

方法

**1. 采用G/R显带核型分析筛选具有复杂核型的初发AML患者**

总结患者特征和预后，对140例初发AML患者进行G/R显带核型分析，具有3种或3种以上的染色体异常者，即确定为伴有复杂核型的AML患者。

**2. 采用PCR、RT-PCR及实时定量RT-PCR检测相关基因突变及MDM4FL、**

**MDM4S的表达**

提取140例初发AML患者骨髓样本的DNA及总RNA，通过PCR、RT-PCR及实时定量RT-PCR方法检测*TP*53、*FLT*3*-ITD*、*AML*1基因突变、*MDM*2、*MDM*4及其剪接体*MDM*4-*S* 的表达水平等，分析各种相关基因的突变 及

*MDM*4*-S*/*MDM*4*-FL*比值的变化。

**3. 构建MDM2、MDM4S慢病毒表达载体**

设计含有*EcoR*Ⅰ和*BamH*Ⅰ酶切位点的引物，上游引物包含起始密码子，下游引物包含终止密码子，以K562细胞cDNA为模板，高保真酶扩增目的基因，通过与载体双酶切，连结，转化感受态，挑克隆测序，将含有正确克隆的菌液摇菌提质粒，-20℃保存备用。将构建成功的各表达质粒pCDH1-MDM2、pCDH1-MDM4S分别与包装辅助质粒pPACKH1-GAG，pPACKH1-REV和pVSV-G磷酸钙共沉淀法共转染293T细胞，包装病毒颗粒，进行滴度测定。包装好的病毒感染HepG2细胞株，并筛选阳性细胞株，扩大培养。

**4. 细胞周期、细胞增殖活性以及P53、P21、BubR1、Securin mRNA和蛋白水**

**平表达检测**

稳定感染*MDM2*、*MDM4S*的HepG2细胞，在中期阻滞剂Nocodazole处理

18小时后，收集细胞，固定，PI染色，流式细胞仪观察细胞周期；采用MTT法检测细胞增殖情况；RT-PCR及Western-blot检测P53、P21、BubR1和Securin基因mRNA和蛋白水平表达变化。

结果

# **1.** 在**140**例初发**AML**患者中筛选出**15**例复杂核型患者

## **1.1** **15**例复杂核型患者的一般特征及预后

15例复杂核型患者中，男女比例为8: 7；年龄≥60岁7例，占46.7%；白细胞数＞100×109/L者2例，占13.3%; FAB分型：M0 1例，M2 4例，M4 5例，M5 5例；核型中，-5: 2例，-7: 4例，-17: 2例，+21: 9例；治疗效果，3例经过1次化疗达到CR，1例经过2次化疗达到CR，部分缓解2例，放弃治疗 2

例。转归：目前死亡13例，存活时间中位数为292天（66-738天）。

## **1.2** **15**例**CK-AML**患者核型分别为：

(1) 49，XY, +13, +19, +21

(2) 52，XXX, +10, +13, +16, +21, +22

(3) 54，XXX, +8, +11, +15, +16, -17, +19, +20, +21, +22

(4) 47，XXY, +1, -2, -5, +12, -17, +19, +21, -22

(5) 56，XXXY, +1, -2, +10, +11, +12, +15, +20, +21, +21, +22

(6) 49，Y, +1, +5, -7, +8, +13, +21

(7) 50，XX, +16, +19, +20, +21

(8) 51，XX, -7, +13, +15, +21, +21, +21, +22

(9) 92，XXXX

(10) 49，XY, +6, add(7)(p22), +8, add(11)(q25), +15

(11) 49，Y, +1, +5, -7, +8, -11, +13, +22, +t(11;17) (q23; q21)

(12) 51，XY, -7, +13, +15, +16, +19, +22, +22

(13) 48，XXY, +1, -2, -5, +12, +18

(14) 50，XX, +1, -7, +8, +13, +15, +19

(15) 51，XXX, +10, +13, +15, +16

# **2.** 初发急性髓系白血病相关基因突变及***MDM4-S*/*MDM4-FL***表达分析

## **2.1** 基因突变检测结果

15例CK-AML患者*TP53*基因在DNA及RNA水平均未检测出突变，但通过FISH检测有两例*TP53*丢失一个拷贝；*AML1*基因各个外显子未检出突变；

*FLT3-ITD*突变率在CK-AML为20%，正常核型AML为23.2%，二者差异无统计学意义（*P*＞0.05）。

## **2.2** 相关基因表达量检测结果

半定量RT-PCR检测复杂核型组与正常核型组的两种剪接体*MDM4-S*、*MDM4-FL* 相对表达量，结果发现复杂核型组*MDM4S*/*MDM4FL* 比值和

*MDM4-S*/*MDM4-*total 比值均高于正常核型组，差异具有统计学意义（*P*＜0.05）。

实时定量RT-PCR检测*MDM*2、*MDM*4*FL*和*MDM*4*S*表达量，经统计学分析，复杂核型组与正常核型组相比，*MDM*2表达水平无差异（*P*＞0.05），复杂核型组*MDM*4*-FL*和*MDM*4*-S*相对表达量高于正常核型组，差异具有统计学意

义。（*P*＜0.05）

# **3**. ***MDM*2**、***MDM*4*-S***基因慢病毒表达载体的构建与感染

通过测序鉴定，*MDM*2、*MDM*4*-S*序列与GeneBank中序列一致，读码框未发生移位。包装病毒并进行滴度测定。包装好的病毒感染HepG2细胞株，并筛选阳性细胞株，扩大培养。本实验中阳性率达到了60%～80%，得到纯度较高的稳定转染了目的基因的细胞。

# **4.** 细胞周期及细胞增殖实验

## **4.1** 细胞周期检测

Nocodazole处理18h后，空白质粒组细胞停留在4N，即M期百分比为

51.94%，其余两组4N的百分比分别为：MDM2:33.35%；MDM4S: 37.32%。与空白对照组相比，稳定转染MDM2和MDM4S的两组细胞4N细胞比值减少，即

M期所占比例减少，具有统计学意义（*P*＜0.05）。

## **4.2** **Nocodazole**处理不同时间点**G0/G1**期细胞所占的比例

在Nocodazole处理0h, G0/G1期细胞所占的比例大约在40%～60%，到8h，三组细胞G0/G1期细胞所占的比例明显下降，随着作用时间的延长，三组细胞

G0/G1期细胞所占的比例逐渐上升，在Nocodazole处理18h时稳定转染MDM2和MDM4S的两组细胞与空白对照组相比差异具有统计学意义（*P*＜0.05）。说明中期阻滞在MDM4S组降低。

## **4.3** 细胞增殖实验

MTT检测空白质粒组、MDM2和MDM4S细胞活性，与空白对照组比较，稳定表达MDM2与MDM4S细胞增殖活性升高，具有统计学意义（*P*＜0.05）。

# **5.** **Real-time RT-PCR**

## 5.1 稳定表达MDM2、MDM4S组*TP53* mRNA相对表达量与空白质粒组相比，差异均无统计学意义（*P*＞0.05）。

## 5.2 Nocodazole处理组与对照组相比，稳定表达MDM2、MDM4S 组*BubR*1

mRNA表达水平下降，差异具有统计学意义（*P*＜0.05）；稳定表达MDM4S 组

*Securin* mRNA表达水平下降，差异具有统计学意义（*P*＜0.05）。Nocodazole

处理空白质粒组，*Securin* mRNA表达升高，与DMSO处理组相比具有统计学意义（*P*＜0.05）。

# **6.** **western-blot**检测

## **6.1** **P53**、**P21**表达水平

稳定表达MDM2细胞P53、P21表达水平下降，与对照组相比具有统计学意义（*P*＜0.05）。稳定表达MDM4S细胞P21蛋白表达水平降低，与对照组相比具有统计学意义；P53蛋白表达水平与对照组相比，差异无统计学意义（*P*＞

0.05)。

## **6.2** **BubR1**、**Securin**表达水平

Nocodazole处理后18h后，稳定表达MDM2和MDM4S细胞中BubR1蛋白和Securin蛋白表达水平下降，差异具有统计学意义（*P*＜0.05）。空白质粒组在Nocodazole处理后，Securin蛋白表达水平升高，差异具有统计学意义（*P*＜

0.05)。

结 论

1. 复杂核型组*MDM*4-*S*相对表达量高于正常核型组。

2. 稳定转染MDM2、MDM4-S细胞株纺锤体检查点功能减弱。

3. 提高细胞内*MDM*4S/*MDM*4FL比值，可抑制P53通路活性。

4. 表达野生型P53的急性髓系白血病患者复杂核型的形成与MDM4-S高表达抑制P53通路活性，进而导致纺锤体检查点功能减弱有关。

关键词

急性髓系白血病；复杂核型；鼠双微体基因2（*MDM*2）；鼠双微体基因 4

（*MDM*4）；鼠双微体基因4短剪接体（*MDM*4*S*）；P53；纺锤体检查点

**Expression of MDM4S in Acute Myeloid Leukemia and its Contribution to Complex Karyotype Formation**

**ABSTRACT**

**Objective**

The incidence of complex karyotype(CK) is 10% to 15% in adult patients with acute myeloid leukemia(AML). Moreover, it has become clear that the incidence of complex karyotype increases with age. CK is an independent adverse prognostic factor in AML, with low complete remission(CR) rate, poor prognosis and lacking of effective chemotherapy. We have found 15 patients with complex karyotype in 140 *de*

*Novo* AML patients by G/R karyotype analysis, this study was designed to discuss the relationship between the short isoform of mouse double minute 4(MDM4-S) and CK-AML. We detected the expression level of full-lenth *MDM*4(MDM4-FL) and

*MDM*4-S in *de novo* CK-AML and normal karyotype AML patients(NK-AML). In order to explore the possible mechanism for the formation of complex karyotype, we constructed a lentiviral vector, and transferred the exogenous MDM4S into HepG2 cell lines. Cell cycle, cell proliferation and the expression level of *P53*, *P21*, *BubR1* and *Securin* were detected in HepG2 cells stably expressing MDM4S or vector control.

**Methods**

**1. To screening CK-AML patients from *de novo* AML using karyotype analysis**

To summary the characteristics and prognosis of CK-AML patients. Conventional Cytogenetics(G or R banding) was performed at the time of diagnosis of 140 patients.

**2. Gene mutation and *MDM*4FL, *MDM*4S expression by means of PCR, RT-PCR, real-time RT-PCR and direct sequencing.**

To screening mutations of *TP*53, *FLT*3-ITD, *AML*1 by direct sequencing of PCR products. To detect the expression level of *MDM*2, *MDM*4*FL* and *MDM*4*S* by means of RT-PCR or real-time RT-PCR.

***3.* To construct lentiviral expression vectors of *MDM2*、*MDM4S***

To design primers containing *EcoR*Ⅰand *BamH*Ⅰsites, the forward primer includes initiation codon and the reverse primer includes termination codon. *MDM*2 and *MDM*4S fragments were amplified by PCR. cDNA templates came from the reverse transcription of K562 cell line total RNA. *MDM*2 and *MDM*4S fragments were linked to lentiviral expression vector.

For construction of the pCDH1-MDM2 or pCDH1-MDM4S plasmid, the pCDH1, MDM2 and MDM4S fragments were digested by *EcoR*Ⅰand *BamH*Ⅰ,

Then linked respectively. 293T cells were cotransfected with 10μg pCDH1-MDM2 or pCDH1-MDM4S and 10μg pCDH packaging vectors using calcium phosphate coprecipitation. Virus was collected 48 hours and 72 hours after transfection. HepG2 cells in 6-well plate were infected. The infection rates were observed by fluorescence microscopy.

**4. Cell cycle and cell proliferation assay**

Cells stably expressing MDM4, MDM4S or vector control were cultured overnight and 0.1μg /ml nocodazole was added the following day for 18 hours. Cells were stained by PI and cell cycle was detected by flow cytometry(FCM). Cell proliferation was analyzed using the MTT assay. After 4h incubation with MTT reagent, cells were lysed with DMSO for 10 min at 37°C and absorbance was measured at 570 nm. The average percentage is shown for 3 independent HepG2 vector control, MDM2 or MDM4S-expressing pools.

**5. RT-PCR**

The mRNA expression level of *TP53*, *BubR*1, *Securin*, were detected in HepG2 cells stably expressing MDM2, MDM4S or vector control by RT-PCR.

**6. Western-blot**

The expression level of P53, P21, BubR1 and Securin were detected by Western-blot.

**Results**

# **1.** **15 CK-AML patients were identified from 140 *de novo* AML patients**

## **1.1** **The characteristics and prognosis of 15 patients with complex karyotype**

In the entire cohort of 15 CK-AML, the median age was 59 years(range,17-80 years), and 7(46.7%) of which≥60 years. The male/female ratio was 1.14(8:7).

2(13.3%) patients had WBC count greater than 100×109/L. There are 1 patient with M0, 4 with M2, 5 with M4 and 5 with M5 according to FAB classifications. Karyotype analysis shows monosomy 5(-5)(n=2), monosomy 7(-7)(n=4), +21(n=9). Of these 15 patients assessable for therapy response and survival, 4 achieved CR, 2 achieved PR. 13 patients died till now. The median survival time was 292 days (range 66-738 days).

## **1.2** **The karyotype of the 15 patients are as follows:**

(1) 49，XY, +13, +19, +21

(2) 52，XXX, +10, +13, +16, +21, +22

(3) 54，XXX, +8, +11, +15, +16, -17, +19, +20, +21, +22

(4) 47，XXY, +1, -2, -5, +12, -17, +19, +21, -22

(5) 56，XXXY, +1, -2, +10, +11, +12, +15, +20, +21, +21, +22

(6) 49，Y, +1, +5, -7, +8, +13, +21

(7) 50，XX, +16, +19, +20, +21

(8) 51，XX, -7, +13, +15, +21, +21, +21, +22

(9) 92，XXXX

(10) 49，XY, +6, add(7)(p22), +8, add(11)(q25), +15

(11) 49，Y, +1, +5, -7, +8, -11, +13, +22, +t(11;17) (q23; q21)

(12) 51，XY, -7, +13, +15, +16, +19, +22, +22

(13) 48，XXY, +1, -2, -5, +12, +18

(14) 50，XX, +1, -7, +8, +13, +15, +19

(15) 51，XXX, +10, +13, +15, +16

# **2.** **Gene mutation and expression of *de novo* AML**

## **2.1** **The results of gene mutation**

PCR products of *TP53* and *AML*1 in 15 CK-AML patients were sequenced and no mutation were found. FISH test showed that 2/15 cases had lost one copy of *TP53*. The positive rates of *FLT*3-ITD were 20% and 23.2% in CK-AML and NK-AML

Respectively, the difference being not statistically significant(*P*＞0.05).

## **2.2** **The results of gene expression level**

The expression ratio of *MDM*4*S*/*MDM*4*FL* and *MDM*4*-S*/*MDM*4-total were higher in CK-AML than in NK-AML. The difference were statistically significant(*P*

＜0.05).

The difference of mRNA expression levels of *MDM*2 were not statistically significant in CK-AML and NK-AML(*P*＞0.05). The expression levels of *MDM*4-*S* and *MDM*4-*FL* were higher in CK-AML than in NK-AML, the difference being statistically significant(*P*＜0.05).

# **3**. **To construct lentiviral expression vectors of *MDM2*, *MDM4S* and infect HepG2**

**Cell line**

The sequences of the pCDH1-MDM2 or pCDH1-MDM4S plasmid were consistent with the GeneBank. Virus were packaged in 293T cells and the titer was

Determined. HepG2 cells were infected with pCDH1-MDM2 or pCDH1-MDM4S. In our test, the positive infection cells were of 60% to 80%.

# **4.** **Cell cycle and cell proliferation assay**

## **4.1** **Cell cycle**

Cells stably expressing MDM2, MDM4S or vector control were cultured overnight and 0.1μg /ml nocodazole was added the following day for 18 hours. The percentage of cells in M phase of cell cycle in vector control was 51.94%, cells stably expressing MDM4, MDM4S were 33.35% and 37.32%, respectivaly. Compared with the vector control, there are fewer cells in M phase in stably expressing MDM2,

MDM4S, the difference being statistically significant(*P*＜0.05).

The percentage of cells in G0/G1 phase of the cell cycle following nocodazole treatment for 0, 8, 12 or 18 hours. In 0 h, it was about 40%～60%. In 8 h, the

Percentage was decreased sharply. The percentage was gradually increased with the prolonged nocodazole treatment. Following nocodazole treatment for 18 h, the percentage of cells in G0/G1 phase in stably expressing MDM2, MDM4S were more

Than vector control, the difference being statistically significant(*P*＜0.05).

## **4.2** **Cell proliferation assay**

The average percentage were increased in MDM2 and MDM4S. Compared with vector control, the difference being statistically significant(*P*＜0.05).

# **5.** **Real-time RT-PCR**

## ***5.1*** **The expression levels of *TP53***

Compared with vector control, the expression level of *TP53* mRNA in stably expressing MDM2, MDM4S cells had not statistically significant(*P*＞0.05).

## **5.2** **The expression levels of BubR1 and Securin**

Compared with control, the expression level of *BubR1* mRNA in stably expressing MDM2, MDM4S cells were decreased, the difference being statistically

Significant(*P*＜0.05). The expression of *Securin* mRNA in stably expressing MDM4S

Cells were decreased, the difference being statistically significant(*P*＜0.05). Following nocodazole treatment, the expression level of *Securin* mRNA increased in

Vector control compared with DMSO treatment cells, the difference had statistically significant(*P*＜0.05).

# **6.** **western-blot**

## **6.1** **The expression levels of P53**、**P21**

Compared with vector control, the expression level of P53 in stably expressing

MDM2 decreased and had statistically significant(*P*＜0.05), the expression level of P53 in stably expressing MDM4S had not statistically significant(*P*＞0.05). The expression level of P21 was decreased in stably expressing MDM2, MDM4S cells.

## **6.2** **The expression levels of BubR1 and Securin**

Compared with vector control, the expression level of BubR1 and Securin in stably expressing MDM2, MDM4S cells were decreased following nocodazole

Treatment, the difference being statistically significant(*P*＜0.05). Following

Nocodazole treatment, the expression level of Securin increased in vector control, compared with DMSO treatment cells, the difference had statistically significant(*P*＜0.05).

**Conclusion**

1. The relative expression level of *MDM*4S is higher in CK-AML than in normal karyotype AML.

2. Cells stably expressing MDM4-S have a weakened spindle checkpoint.

3. Overexpression of MDM4-S, so increasing the MDM4-S/ MDM4-FL ratio in cells can inhibit the activity of P53 pathway.

4. The mechanism of the complex karyotype are partly due to the inhibition of the P53 pathway and the weakness of spindle check point by overexpression

MDM4-S.

**KEy words**

Acute myeloid leukemia(AML); complex karyotype; mouse double minute 2

(*MDM*2)；mouse double minute 4(*MDM*4)；short isoform of *MDM*4

(*MDM*4*S*)；P53; spindle checkpoint

第一部分 伴复杂核型初发急性髓系白血病患者临床及细胞遗传学特征分析

前 言

急性髓系白血病（Acute Myeloid Leukemia, AML）是一种异质性的恶性血液系统肿瘤，核型分析对于AML的诊断、治疗及预后判断均具有重要的价值[1, 2]。已有的研究表明，在AML预后中，复杂核型是独立的预后不良因素，尤其是伴有单体型的复杂核型患者[3, 4]。

伴复杂核型AML大约占成人AML的10%～15%，随着年龄的增长，发生率增加。复杂核型是1998年由英国的the Medical Research Council AML Working

Group（MRC）定义为至少5种细胞遗传学异常称为复杂核型[5]。伴有t(8;21), t(15;17) or inv（16）的AML被认为具有较好的预后，不伴有上述染色体改变的患者，但是伴有-5，del(5q)，-7或者3q异常被认为是预后差的标志。其余包括11q23异常，+8，+21, +22, del(9q)，del(7q)或者其他多种结构及数目异常均与预后不良相关，该小组通过对10个临床观察的总结，将细胞遗传学检测结果作为独立的预后因素，提出了上述复杂核型的定义。

2002年，A Cancer and Leukemia Group B (CALGB)的研究发现，核型分析中，

≥3, 4, or 5种异常其预后相同，因此将复杂核型定义为至少3种细胞遗传学异常者称为复杂核型[6]。2008年，WHO将原来伴有3种或3种以上获得性的染色体异常的“AML伴有再现性的核型异常”重新定义为伴复杂核型的AML(AML with complex karyotype, CK-AML)。

复杂核型是急性髓系白血病独立的预后不良因素，临床化疗缓解率低，预后差，缺乏有效的化疗方案，因此复杂核型形成的机制也成为目前研究的热点问题。我们对140例初发急性髓系白血病患者进行G/R显带核型分析，筛选伴复杂核型的AML患者，并对其临床特征和预后进行了总结。

研究对象和方法

**1. 研究对象**

2010年1月至2012年12月间ft西医科大学第二医院血液科住院及门诊初发AML患者260例，全部病例经临床、细胞形态学、细胞遗传学、流式细胞术及分子生物学联合确诊。筛选*AML1-ETO*及*CBFβ-MYH11*融合基因阴性且临床资料完善的病例140例，记录患者一般状况、发病时白细胞数、是否缓解等指标。所有患者均签署知情同意书。

**2. 主要仪器和试剂**

## **2.1** 主要仪器

MILLQ超纯水仪 MillQ公司，U. S. A

微量移液器Eppendorf公司，German

恒温培养箱 SHELDON2300 U. S. A

SW-CT-1F 超净工作台 苏净集团安泰公司，中国

Sartorius CP1245电子天平Olympus, Japan

## **2.2** 主要试剂

NaCl潍坊宝盛化工有限公司中国

胰蛋白酶 solarbio Spain

秋水仙碱 sigma U. S. A

RPMI 1640 培养液 四季青 中国

小牛血清 四季青 中国

## **2.3** 部分溶液配制：

（1）Giemsa原液：

Giemsa粉剂1g置研钵中，边加入少量甘油边研磨，直至无颗粒为止，共加入66ml分析纯甘油，在水浴锅中加温65℃约2h左右，使染料完全溶解。冷却后加入纯甲醇66ml，充分混合，再在水浴锅中加温15min，过滤后放入棕色瓶中，37℃温箱中24h，即成Giemsa原液。临用时用pH6.8的PBS缓冲液7～

10倍稀释。

（2）0.05%秋水仙碱溶液：

称取0.05g秋水仙碱，加入100ml灭菌生理盐水中。

（3）0.25%胰蛋白酶溶液：

胰蛋白酶0.25g，加入100ml 0.85% NaCl溶解，用4%NaHCO3 调整

pH=7.2，过滤除菌，4℃保存。

（4）Carnoy固定液：甲醇与冰醋酸按3：l容积混合即可，现配现用。

（5）0.075 mol/L KCl溶液：称取KCl 0.559g，溶于100 ml蒸馏水中。

（6）R显带液：NaCl 6.8g

KCl 0.4g

NaH2PO4·2H2O 0.164g

MgSO4·7H2O 0.2g

葡萄糖1.0g

酚红10mg

Na2HPO4 0.2～0.3g

无水CaCl2(最后加) 0.2g

加去离子水定容至1000ml，加热搅拌2～4h，pH 6.5。

（7）PH=6.8 PBS：

A液：1/15 mol/L KH2PO3: 称取9.078g KH2PO3溶于1000ml蒸馏水中。

B液：1/15 mol/L Na2HPO3: 称取11.876g Na2HPO3溶于1000ml蒸馏水中。临用时，A液50.8ml, B液49.2ml混匀即可。

（8）1640培养液：

RPMI1640培养液89ml

小牛血清10ml

肝素1ml

混匀后，用4%NaHCO3调整pH值为7.2～7.4，分装至培养瓶中。

**3. 实验方法和步骤**

## **3.1** **140**例初发**AML**一般特征

记录140例初发AML患者的临床特征及患者一般状况、发病时白细胞数、是否缓解等指标。

## **3.2** 初发急性髓系白血病患者**G/R**显带核型分析

### **3.2.1** 骨髓细胞培养及制片

（1）取新鲜骨髓标本，显微镜下进行细胞计数，按细胞数量加0.3 ml～1 ml骨髓至5 ml 1640（含10%小牛血清）培养液中，混匀，37℃恒温培养箱中培养24 h。

（2）收获前1 h加入0.05%秋水仙碱8～10滴，混匀，继续培养1h。

（3）收获细胞：将培养好的骨髓细胞吹打混匀，移入离心管中，离心，

1000rpm，8min，弃上清。

（4）低渗：细胞沉淀中加入5 ml预热37℃的0.075 mol/L KCl低渗液，吹打混匀，37℃低渗20 min，中间吹打2～3次。

（5）预固定：低渗液中加入1ml新配制的Carnoy固定液，混匀，离心，

1000rpm，8min，弃上清。

（6）固定：细胞沉淀中加入5 ml新配制的Carnoy固定液，吹打混匀，室温下固定20 min。离心，弃上清。

（7）细胞沉淀中再加入5 ml新配制的Carnoy固定液，重复固定一次，吹打混匀，室温下固定20 min。离心，弃上清。

（8）制备细胞悬液，滴片：根据细胞沉淀的多少加入固定液0.5 ml～1 ml，吹打混匀，将预冷的载玻片倾斜30o，用吸管吸取细胞悬液，距玻片35cm处滴

2～3滴，酒精灯上方迅速烘干备用。

### **3.2.2** **G**显带核型分析

（1）染色体标本老化：将制备好的玻片标本在80～90℃烤箱内烘烤3 h左右，使标本老化。

（2）胰蛋白酶处理：配制好的0.25%胰蛋白酶溶液放于立式染色缸中，置

37℃水浴箱内预热30 min后，将老化的标本片置于胰蛋白酶溶液中数秒，立即取出玻片，在预热37℃的0.85% NaCl溶液中漂洗两次，晾干。

（3）Giemsa染色：将标本放入Giemsa工作液（pH=6.8，Giemsa原液：磷酸缓冲液=1: 9）中染色12 min～15 min。蒸馏水冲洗，空气干燥。

（4）镜下观察：低倍镜下寻找分散良好的分裂相，换油镜观察，每个标本观察20个分散良好，染色均匀的分裂相，观察并记录染色体数目和结构畸变类型。

### **3.2.3** **R**显带核型分析

（1）将制备好的玻片标本放入85℃预热的R显带液中85℃孵育50 min～70 min，取出后蒸馏水冲洗，晾干。

（2）Giemsa染色：将标本放入Giemsa工作液（pH=6.8，Giemsa原液：磷酸缓冲液=1: 9）中染色12 min～15 min。蒸馏水冲洗，空气干燥。

（3）镜下观察：低倍镜下寻找分散良好的分裂相，换油镜观察，每个标本观察20个分散良好，染色均匀的分裂相，观察并记录染色体数目和结构畸变类型。

结果

**1．140例初发AML患者的一般特征**

140例初发AML患者的一般特征见表1-1。从表中可以看出，140例初发髓系白血病患者中，年龄中位数为51(15-80)岁，年龄≥60岁占32.9%，男女比例为87: 53，白细胞数中位数为42（0.73-462）×109/L，血小板中位数为38（7.3-212）

×109/L，发病时白细胞数＞100×109/L者20例，占14.3%，复杂核型15例，占

10.7%。

表 1-1 140例患者的一般特征

Characteristic

Median age, y(range) 51(14-80)

≥60 y

Age no. subjects(%)

≤59 y

46(32.9%)

94(67.1%)

Gender (M: F) 87:53

Median WBC 109/L(range) 42(0.73-462) Median Platelet count,109/L(range) 38(7.3-212)

Cytogenetics

WBC(109/L) no. subjects(%)

Normal Complex

＞100

＜50

125(89.3%)

15(10.7%)

20(14.3%)

57(40.7%)

#### **2.** **15**例**CK-AML**患者一般特征及预后

15例CK-AML患者的一般特征及预后见表1-2。从表中可以看出，15例CK患者中，男女比例为8: 7；年龄≥60岁7例，占46.7%；白细胞数＞100×109/L者2例，占13.3%; FAB分型：M0 1例，M2 4例，M4 5例，M5 5例；核型分析结果：-5（2例），-7（4例），-17（2例），+1（3例），+21（9例），+13(6例)，四倍体1例；治疗效果，3例经过1次化疗达到完全缓解，1例经过2次化

疗达到完全缓解，部分缓解2例，未缓解8例，放弃治疗2例。转归：目前死亡13例，存活时间中位数292天（66-738天）（表1-2）。

表 1-2 15例复杂核型患者一般特征及预后

**编**年性

**FAB**

**WBC**

**血小板**

**治疗缓**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **号** | **龄** | **别** | **分型** | **(109/L)** | **数(109/L)** |  | **解情况** |  | **（d）** |
| 1 | 59 | 女 | M2 | 40.9 | 38.7 | 54,XXX.+8,+11,+15,+16, | CR | 死亡 | 92 |
|  |  |  |  |  |  | -17,+19,+20,+21,+22 |  |  |  |
| 2 | 76 | 男 | M5 | 1.13 | 24.9 | 49,XY,+6,add(7)(p22),+8, | 放弃治 | 死亡 | 123 |
|  |  |  |  |  |  | add(11)(q25),+15 | 疗 |  |  |
| 3 | 22 | 男 | M2 | 18.9 | 80.2 | 49，Y,+1，+5，-7，+8， | CR | 死亡 | 366 |
|  |  |  |  |  |  | -11，+13，+22，+t(11;17) |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  | (q23;q21) |  |  |  |
| 4 | 17 | 男 | M5 | 106 | 58.3 | 51,XY,-7,+13,+15,+16,+1 | PR | 死亡 | 515 |
|  |  |  |  |  |  | 9,+22,+22 |  |  |  |
| 5 | 44 | 男 | M4 | 69.7 | 26.9 | 48,XXY,+1,-2,-5,+12,+18 | NR | 死亡 | 275 |
| 6 | 62 | 女 | M5 | 30 | 23.1 | 50,XX,+1,-7,+8,+13,+15， | NR | 死亡 | 178 |
|  |  |  |  |  |  | +19 |  |  |  |
| 7 | 62 | 男 | M5 | 0.77 | 141 | 49,Y,+1,+5,-7,+8,+13,+21 | NR | 死亡 | 330 |
| 8 | 64 | 女 | M5 | 2.02 | 11.7 | 50,XX,+16,+19,+20,+21 | NR | 死亡 | 292 |
| 9 | 80 | 女 | M4 | 83.7 | 80.1 | 51,XX,-7,+13, | 放弃治 | 死亡 | 390 |
|  |  |  |  |  |  | +15,+21,+21,+21,+22 | 疗 |  |  |
| 10 | 62 | 男 | M4 | 26 | 52.5 | 49,XY,+13,+19,+21 | PR | 死亡 | 445 |
| 11 | 44 | 女 | M4 | 79.9 | 10.6 | 52,XXX,+10,+13,+16,+2 | NR | 死亡 | 75 |
|  |  |  |  |  |  | 1,+22 |  |  |  |
| 12 | 48 | 女 | M0 | 4.17 | 8.8 | 92,XXXX | NR | 死亡 | 66 |
| 13 | 55 | 男 | M2 | 33.5 | 21.7 | 47,XXY,+1,-2,-5,+12-17, | NR | 死亡 | 738 |
|  |  |  |  |  |  | +19,+21,-22 |  |  |  |
| 14 | 67 | 男 | M4 | 147 | 38.1 | 56,XXXY,+1,-2,+10,+11, | CR | 存活 | 340 |
|  |  |  |  |  |  | +12,+15,+20,+21,+21,+2 |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  | 2 |  |  |  |
| 15 | 44 | 女 | M2 | 2.48 | 17.1 | 51,XXX,+10,+13,+15,+1 | CR | 存活 | 269 |
|  |  |  |  |  |  | 6 |  |  |  |

**核**型

**生存期**

**转 归**

注：CR，完全缓解；PR，部分缓解；NR：未缓解；d: day

#### **3.** **G**或**R**显带核型分析结果：

**3.1部分患者G显带核型分析结果：**（图1-1）患者的核型分别为：

A. 49, XY, +13, +19, +21;

B. 52, XXX, +10, +13, +16, +21, +22;

C. 54, XXX, +8, +11, +15, +16, -17, +19, +20, +21, +22; D. 47, XXY, +1, -2, -5, +12, -17, +19, +21, -22;

E. 56, XXXY, +1, -2, +10, +11, +12, +15, +20, +21, +21, +22;

F. 46, XX

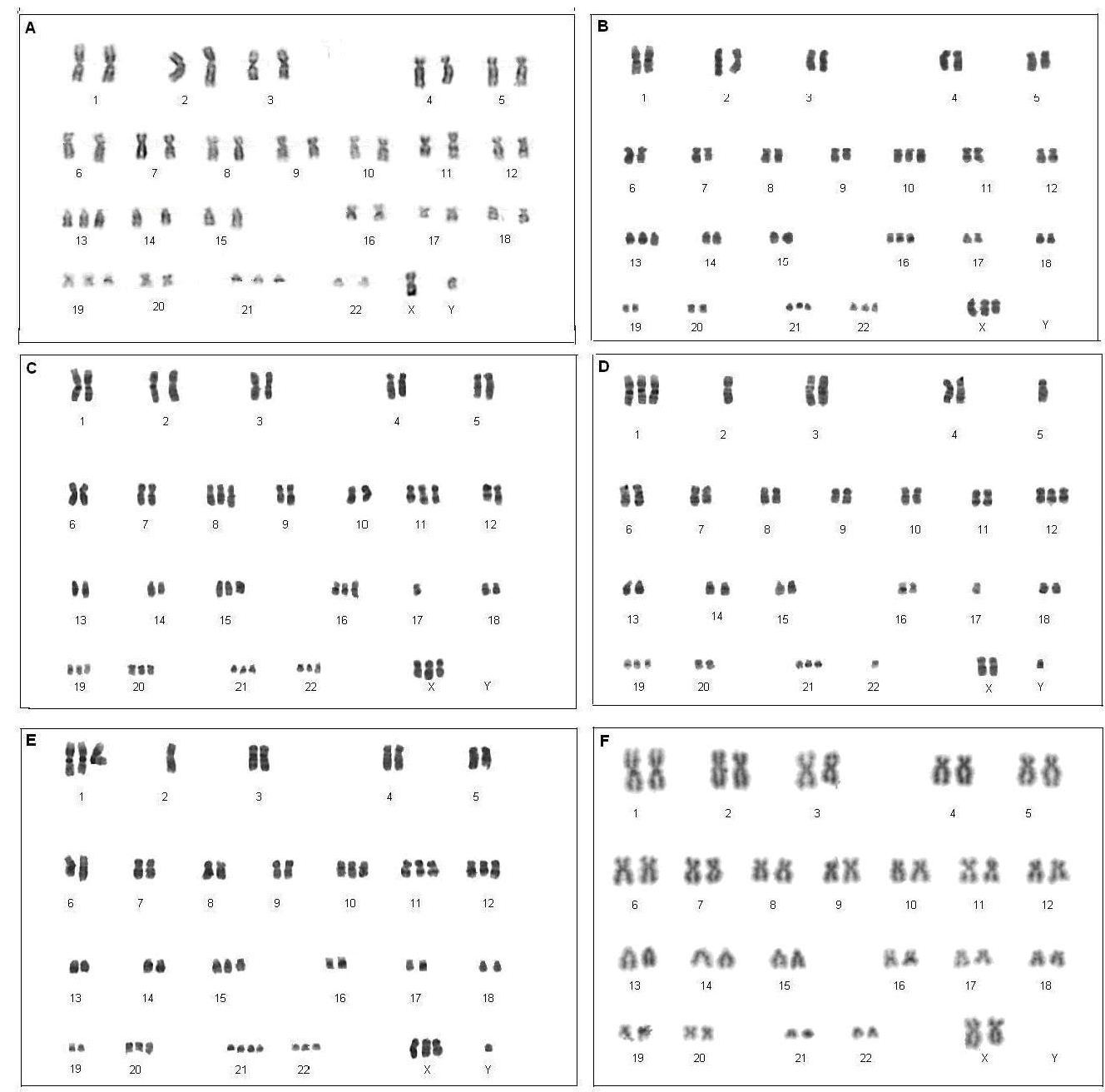


图1-1 部分患者G显带核型分析结果

图1-1 部分患者G显带核型分析结果：A～E为5例复杂核型患者核型分析结果，

F为一例正常核型患者。

**3.2部分患者R显带核型分析结果**（图1-2）A. 49, Y, +1, +5, -7, +8, +13, +21;

B. 50, XX, +16, +19, +20, +21;

C. 51, XX, -7, +13, +15, +21, +21, +21, +22;

D.92, XXXX

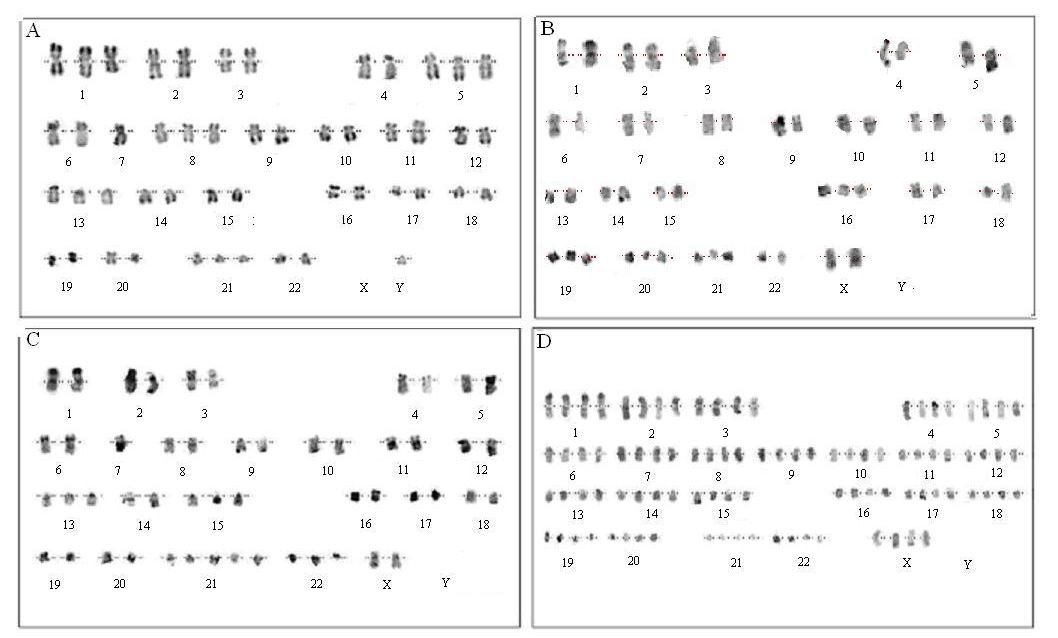


图1-2部分患者R显带核型分析结果。A～D为4例复杂核型患者核型分析结果。

D为一例四倍体患者。

讨论

**1. 核型分析在AML中的应用价值**

传统的细胞遗传学检查是对染色体显带核型进行分析，由于能对全部染色体上的异常进行检测，并且技术成熟，因而显带核型仍然是细胞遗传学分析的首选技术，也是临床细胞遗传学检测最常用的技术。G/R显带时间短，染色是永久性的，标本可以长期保存，无需避光，带纹分析通常较好，用普通光学显微镜即可观察，便于一般实验室常规检查，因而是最常使用的细胞遗传学诊断技术。我们应用G/R显带技术对140例初发急性髓系白血病患者进行了核型分析，从中筛选出15例具有3种或3种以上染色体畸变的患者，即伴有复杂核型的

AML患者。该技术的不足之处在于：首先，它必须依赖于质量较好的中期分裂相，因此当分裂相缺如或质量较差时，显带核型的分析就发生困难；其次，它只能分析大于1条带（大于104kb）的异常，因此无法检出较小的染色体缺失或者重排[7]。

G/R显带技术作为最基本的检查，荧光原位杂交技术（fluorescence in situ hybridization, FISH）则是其重要的补充，二者结合可提供更全面的遗传学信息。多色荧光原位杂交（multiplex fluorescence in situ hybridization, M-FISH）技术有助于阐明复杂核型异常中标记染色体和衍生染色体的来源[8]。

光谱核型分析（spectral karyotyping, SKY）采用5种荧光随机组合，通过 1

次杂交就可同时使人类24条染色体显示不同的颜色，可鉴别染色体重排，特别是易位、插入及可以产生标记染色体的许多复杂的染色体结构畸变，对各种标记染色体的来源可清楚判断。SKY和M-FISH技术的应用使染色体畸变的判断和定位更加准确[9]。比较基因组杂交（comparative genomic hybridization, CGH）和array-CGH可提供复杂核型更精确的细节[10, 11]。

AML中10％～12％的复杂染色体核型单靠G/R显带尚不能阐明其异常的性质，近年来，许多学者应用新的分子遗传学和分子生物学技术，揭示了G/R显带未检出的隐匿异常，阐明了复杂核型异常的性质。

**2. 复杂核型对急性髓系白血病预后的影响**

急性髓系白血病是一类异质性血液系统的恶性肿瘤，影响AML预后因素的研究较多。年龄≤60 岁预后较好，年龄≥60 岁预后差。在细胞遗传学方面，

t(8;21)，t(15; 17)，t(16;16)和inv（16），预后良好，5年生存率65%；复杂核型尤其是伴有单体型核型，如-5/5q-，-7/7q-等预后较差，5年生存率10-15%；中等的预后大约占AML的50–60%，包括正常核型和其他的核型异常者，5年生存率45%。在分子生物学检测方面，c-kit突变在正常核型对预后无影响，在t(8; 21)中c-kit突变表示预后差；*CEBPA*突变在正常核型AML预后好，而*BAALC*基因过表达与预后不良有关，并且与高复发率及低OS相关；*MLL-PTD*预后差；*NPM1*(+) / *FLT3-ITD*(-)预后较好，而*NPM1*(+) / *FLT3-ITD*(+)或者-/-或者-/+预后差[12, 13]。

我们从140例初发急性髓系白血病患者中通过核型分析发现，15例为伴有 3

种或3种以上染色体异常的复杂核型，发生概率达到10.7%。其中2例伴有-5，

4例伴有-7，2例伴有-17的单体型核型。通过随访发现，15例复杂核型患者中只有4例患者通过1次或2次化疗达到完全缓解（CR），2例部分缓解（PR），

2例放弃化疗，其余患者均未缓解。15例患者中死亡13例，存活时间中位数为

292d（66d-738d），说明该组患者治疗效果较差，缓解率低，生存时间短。

伴复杂核型尤其是单体型核型的AML治疗效果较差，缓解率低，且预后不良[12-16]，如何提高该类患者的缓解率和生存率是目前研究的热点[17]，但是对于复杂核型形成的机制仍然不清楚，本研究将从分子生物学方面对其发生机制进行探讨。

第二部分初发急性髓系白血病相关基因突变及MDM4-S/MDM4-FL的表达分析

前 言

复杂核型是急性髓系白血病独立的预后不良因素，临床化疗缓解率低，预后差，缺乏有效的化疗方案，因此复杂核型形成的机制成为目前研究的热点问题，人们试图从形成机制方面入手找到有效的治疗靶点。从实体瘤的研究中，很容易想到*TP53* 基因的突变与染色体不稳定的关系。*TP53* 突变涉及到大约

50%～70%的人类恶性肿瘤，主要见于实体瘤中，在血液系统肿瘤中发生率较低，

大约为10%～20%[18]。

2012年，Rucker FG[19]等分析了234例伴复杂核型的AML患者的*TP53*及其相关基因的突变情况，CK-AML中*TP53*突变率为70%，**说明*TP53*基因突变在复杂核型形成中起着重要的作用。**CK-AML中*TP53*突变率为70%，那么剩余的30%表达野生型P53 的AML 患者，其复杂核型形成的机制又是如何？

Medeiros BC [17]在对上述文献的评论中，指出Rucker等的工作非常有意义，正在开始揭开AML患者中复杂核型发生的分子机制，但是还有一些问题需要解决，比如占30%的具有野生型P53的CK-AML发病中，是否是由于P53的负性调控基因鼠双微体基因2（mouse double minute 2, *MDM2*）或鼠双微体基因4（mouse double minute 4, *MDM4*）的过表达引起？并且针对MDM2的小分子药物如Nutlin-3a，MI219[20]等应用于临床，取得了一些积极的疗效。针对MDM4的小分子药物应用也取得了一定的进展[21]。Lenos K[22]等在骨肉瘤中的研究中提出，MDM4-S是截短的MDM4蛋白，缺失exon6，只保留P53结合结构域，与P53更有效结合，比MDM4全长（MDM4 full length, MDM4-FL）更有效抑制P53的转录激活功能。作者证实在骨肉瘤中，MDM4S高表达，即MDM4-S/MDM4-FL比例升高，使得骨肉瘤进展并降低总生存率。

在第一部分的研究中，我们通过核型分析从资料完善的140例初发急性髓

系白血病患者中筛选出15例复杂核型患者，通过随访发现，这类患者治疗效果较差，缓解率低，预后不良。在这部分研究中，我们重点检测了与预后有关的

*TP53*基因、*AML1*基因和*FLT3-ITD*(FLT3 internal tandem duplication)突变，检测了*MDM2*、*MDM4*及其剪接体*MDM4-S*的表达水平等，分析各种相关基因的突变及*MDM4-S/MDM4-FL*比值的变化，初步阐明复杂核型形成的可能机制。

研究对象和方法

# **1.** 研究对象和主要仪器试剂

## **1.1** 研究对象和分组

140例初发急性髓系白血病患者，按照核型分析结果分为两组：正常核型组

（125例）和复杂核型组（15例）。

## **1.2** 主要仪器

9700 型PCR仪PE公司，U. S. A

稳压稳流电泳仪Savant PS 250, U. S. A

Gene Amp 5700荧光定量PCR仪PE Applied Biosystems, USA

其他详见第一部分

## **1.3** 主要试剂

Trizol TaKaRa Japan

Random Primer TaKaRa Japan

Oligo(dT) 15 Primer TaKaRa Japan

RNasin Promega, U. S. A

逆转录酶M-MuLV Promega, U. S. A

血液基因组 DNA 提取试剂盒 TIANGEN 中国

TaqDNA聚合酶Fermentas, Canada

DNTP Promega, U. S. A

DEPC SIGMA U. S. A

琼脂糖Solarbio，Spain

引物合成 奥科生物公司，中国 生工生物 中国

DNA 1000 Marker TaKaRa, Japan

DNA 1kb Marker TaKaRa, Japan

DNA 2500 Marker TIANGEN 中国

PBS缓冲液TaKaRa, Japan

P53探针GLP P53北京金菩嘉医疗科技有限公司中国

## **1.4** 主要试剂配方：

DEPC处理H2O: DEPC 1ml，加入1L去离子水中，磁珠搅拌过夜，高压灭菌。

# **2.** 实验方法和步骤

## **2.1** 总**RNA**的提取

取患者EDTA抗凝骨髓标本300μl，用Trizol试剂提取总RNA：

（1）破坏红细胞：骨髓标本中加入1ml DEPC水，混匀，离心，12000 rpm×2

min，弃上清，必要时重复一次。

（2）加入500μl Trizol试剂，剧烈振荡30 sec，加入200μl氯仿，颠倒混匀，离心，4℃, 12000 rpm×10 min，取上清液移入另一个1.5ml EP管中。

（3）加入等量异丙醇混匀，-20℃放置10 min，离心，4℃，12000 rpm×10 min，弃上清。

（4）沉淀中加入200μl预冷的70%乙醇，离心，4℃，12000 rpm×5 min。

（5）弃上清，空气干燥，沉淀中加入RNase-free H2O 20μl，溶解RNA。电泳检测RNA完整性，紫外分光光度计检测RNA的浓度与纯度，总RNA

浓度(μg/ml) =OD260×40 (μg/ml)×稀释倍数，纯度以A260/280表示，1.8~2.0范围的标本认为合格。所有标本在-80℃冰箱冻存备用。

## **2.2** 基因组**DNA**提取，采用**TIANGEN**血液基因组**DNA**提取试剂盒。

（1）取200μl抗凝全骨髓，加入200μl～500μl细胞裂解液CL，颠倒混匀，12000×g，1 min，弃上清。沉淀中加入200μl缓冲液GS，振荡至彻底混匀。

（2）加入20μl Proteinase K溶液，混匀。

（3）加200μl缓冲液GB，充分颠倒混匀，56℃放置10min，其间颠倒混匀数次，溶液应变清亮。

（4）加200μl无水乙醇，充分颠倒混匀，此时可能会出现絮状沉淀。

（5）将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱CB3中，放入收集管，

13000×g，离心30sec，弃去留出液。

（6）向吸附柱CB3中加入500μl缓冲液GD，13000×g，离心30sec，弃去留出液。

（7）向吸附柱CB3中加入700μl漂洗液PW，13000×g，离心30sec，弃去留出液。

（8）向吸附柱CB3中加入500μl漂洗液PW，13000×g，离心30sec，弃去留出液。

（9）将吸附柱CB3放回空收集管中，13000×g，离心2min，取出吸附柱，室温干燥。

（10）将吸附柱CB3放置一新1.5ml离心管中，向吸附膜中央加入去离子水50μl～200μl，室温放置2～5min，13000×g，离心2min，洗脱DNA。

（11）紫外分光光度计检测DNA的浓度与纯度，DNA浓度(μg/ml) =OD260×40 (μg/ml)×稀释倍数，纯度以A260/280表示，1.8~2.0范围的标本认为合格。所有标本在-20℃冻存备用。

## **2.3** 逆转录合成**cDNA**

20μl体系中依次加入下列试剂：

Total RNA 1μg(2-3μl)

Random primer 0.5μl

Oligo(dT) 15 Primer 0.5μl

5×逆转录酶缓冲液4μl

RNasin (50u/μl) 0.5μl

dNTPs(10μmol/L) 2μl

M-MuLV(200U/μl) 1μl

DEPC H2O up to 20μl

离心数秒，混匀，置PCR仪中，42℃60 min，70℃10 min. cDNA置-20℃

保存待用。

## **2.4** **PCR**引物设计

从GeneBank中查找*TP53*、*AML1*、*FLT3-ITD*以及*MDM4*基因DNA或者

cDNA序列，用Primer Premier 5软件设计引物，见表2-1:

表2-1 相关基因PCR引物

| name | forward | Reverse | Length(bp) |
| --- | --- | --- | --- |
| FLT3-ITD | 5′-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3' | 5′-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC-3′ | 328 |
| TP53-外侧 | 5'-CAGACTGCCTTCCGGGTCAC-3' | 5'-GGAGGCTGTCAGTGGGGAAC-3' | 1241 |
| TP53-内侧 | 5'-TCTTGCATTCTGGGACAGCC-3' | 5'-AACATCTCGAAGCGCTCACG-3' | 685 |
| TP53exon4 | 5'-acctggtcctctgactgct c -3' | 5'-gccaggcattgaagtctcat-3' | 363 |
| TP53exon5-6 | 5'–ccgtcttccagttgctttat-3' | 5'-ttaacccctcctcccaga-3' | 488 |
| TP53exon7 | 5'-tgcttgccaca ggtctcc-3' | 5'-ccggggatgtgatgagaggt-3' | 301 |
| TP53exon8-9 | 5'-ttccttactgcctcttgctt-3' | 5'-agaaaacggcattttgagtg-3' | 411 |
| TP53exon10 | 5'-ctcaggtactgtgtatatac-3' | 5'-ctatggctttccaacctagga-3' | 218 |
| TP53exon11 | 5'-tcatctctcctccctgcttc-3' | 5'-ccacaacaaaacaccagtgc-3' | 300 |
| AML1-exon3 | 5'-AGCTGTTTGCAGGGTCCTAA-3' | 5'-GTCCTCCCACCACCCTCT-3' | 338 |
| AML1-exon4 | 5'-CATTGCTATTCCTCTGCAACC-3' | 5'-CCATGAAACGTGTTTCAAGC-3' | 334 |
| AML1-exon5 | 5'-CCACCAACCTCATTCTGTTT-3' | 5'-AGACATGGTCCCTGAGTATA-3' | 226 |
| AML1-exon6 | 5'-GGGGGCCCATTCTGCTGAGAGG-3' | 5'-GAGCATCAAGGGGAAACCCC-3' | 503 |
| AML1-exon7b | 5'-AATCCCACCCCACTTTACAT-3' | 5'-CTCAGCTGCAAAGAATGTGT-3' | 244 |
| AML1-exon8 | 5'-TCCGCTCCGTTCTCTTGC-3' | 5'-GCTTGTCGCGAACAGGAG-3' | 585 |
| ABL | 5'-GAGTTCATGACCTAC GGGAACCT-3' | 5'-GGTACTCCATGGCTGACGAGAT-3' | 115 |
| MDM4 半定量 | 5'-TGCATGCAGCAGGTGCG-3' | 5'-CATTACTTCTAGGTGTAT-3' | 535/468 |

## **2.5** ***TP53***基因突变检测

### **2.5.1** **cDNA**水平突变检测

应用Primer Premier 5软件设计巢式PCR引物，由上海生物工程有限公司合成。引物序列见表2-1。采用巢式RT-PCR扩增*TP53*基因4-9外显子序列。

（1）*TP53*第一轮PCR：50μl体系中加入下列试剂：

cDNA 2 μl

P53 外侧引物 F(10μM) 1 μl

P53 外侧引物 R(10μM) 1 μl

10×PCR Buffer 5μl

dNTP(2.5mM each) 5μl

MgCl2(1.5mM) 3μl

Taq DNA polymerase 2μl

去离子水up to 50μl

离心数秒混匀，置PCR仪上。扩增条件：95℃5 min，95℃30 sec，62℃30 sec，72℃1.5 min, 35个循环，最后72℃延伸10min。

（2）*TP53*第二轮PCR：50μl体系中加入下列试剂：第一轮PCR产物1μl

P53内侧引物F(10μM) 1μl

P53内侧引物R(10μM) 1μl

10×PCR Buffer 5μl

dNTP(2.5mM each) 5μl

MgCl2(1.5mM) 3μl

Taq DNA polymerase 2μl

去离子水up to 50μl

离心数秒混匀，置PCR仪上。扩增条件：95℃5 min，95℃30 sec，60℃30 sec，72℃1 min，35个循环，最后72℃延伸10min。第二轮产物685bp直接送上海生物工程有限公司测序。

### **2.5.2** ***TP53* DNA**水平各个外显子突变检测

应用Primer Premier 5软件分别设计*TP53*外显子4-11的引物，引物位于各外显子相邻的内含子上，具体序列见表2-1。

50μl体系中加入下列试剂：

模板DNA 500 ng～1μg

引物（P53外显子4-11）F(10μM) 1μl引物（P53外显子4-11）R(10μM) 1μl 10×PCR Buffer 5μl

dNTP(2.5mM each) 5μl

MgCl2(1.5mM) 3μl

Taq DNA polymerase 2μl

去离子水up to 50μl

离心数秒混匀，置PCR仪上。扩增条件：95℃5 min，95℃30 sec，退火30 sec，72℃45 sec，35个循环，最后72℃延伸10 min。退火温度根据各个外显子的引物不同而不同，其中exon4和exon11 Tm值为60℃，exon5-6, exon7，exon8, exon9, exon10 Tm值为56℃。扩增产物直接送上海生物工程有限公司测序，出现有突变测序结果则重复一次。

### **2.5.3** **FISH**检测***TP53***基因缺失，探针为金菩嘉公司**GLP P53**探针

（1）收获细胞：取新鲜骨髓标本200μl，加入6～8 ml PBS缓冲液，吹打混匀，离心，1000 rpm, 10 min，弃去上清，重复上述步骤一次。

（2）低渗：加入6～8 ml预热至37℃的0.075 mol/L KCl溶液，吹打混匀细胞，37℃水浴中低渗20 min，期间吹打2～3次，低渗结束后，加入1 ml新配制的Carnoy固定液，吹打混匀，离心。

（3）固定：沉淀中加入6～8 ml固定液，混匀，室温下静置20 min。离心，弃上清。重复固定一次。

（4）制备细胞悬液：弃上清，根据细胞量加入固定液，吹打混匀。（培养的骨髓细胞，-20℃保存，临用时取出骨髓细胞培养液，离心，弃上清，加入新配制的Carnoy固定液，调整细胞浓度，吹打混匀。）

（5）滴片：吸取少量细胞悬液，滴至干净的载玻片上，自然晾干。镜下观察，以细胞之间不相互重叠，分散良好为准。

（6）老化玻片：室温放置过夜或56℃烤片至少30 min，玻片放入预热37℃的2×SSC中30min。

（7）梯度脱水：70%，85%，100%乙醇中脱水各3 min，56℃烤干。

（8）杂交（以下过程均需避光操作）：用6μl杂交缓冲液溶解2μl GLP P53

探针，短暂离心混匀，加入杂交区，加18mm×18mm盖片，注意避免气泡产生，

rubber cement封片，置杂交仪上，75℃5 min，42℃16 h。

（9）洗片：取出玻片，镊子去掉rubber cement，2×SSC中洗掉盖片。

47℃ 2×SSC 10 min室温70%乙醇3 min暗处自然干燥。

（10）复染：加DAPI 8μl，加免洗盖片，暗处放置10 min～20 min后荧光显微镜下观察绿色信号。玻片于-20℃湿盒中避光保存。

## **2.6** ***FLT*3-ITD**突变检测

*FLT*3-ITD是AML患者*FLT*3基因外显子14和15存在内部串联重复( internal tandem duplication, ITD)，近年来对于*FLT*3突变的检测、预后意义以及*FLT*3抑制剂的应用研究比较深入。*FLT*3基因外显子14和15的ITD用基因组DNA PCR进行检测，引物序列见表2-1。

50μl体系中加入下列试剂：

基因组DNA 500 ng～1μg

引物F(10μM) 1μl

引物R(10μM) 1μl

10×PCR Buffer 5μl

DNTP(2.5 mM each) 5μl

MgCl2(1.5 mM) 3μl

Taq DNA polymerase 2μl

去离子水up to 50μl

离心数秒混匀，置PCR仪上。扩增条件：95℃5 min，95℃30 sec，56℃30 sec，72℃45 sec，35个循环，最后72℃延伸10 min。

PCR产物加入10%聚丙烯酰胺凝胶电泳，硝酸银染色观察。野生型FLT3

是一条带，328bp，具有ITD的为两条带。

## **2.7** ***AML1***基因突变检测

DNA水平各个外显子突变检测：应用Primer Premier5软件分别设计*AML1*

基因外显子3～8的引物，引物位于各外显子相邻的内含子上，引物序列见表2-1.50μl体系中加入下列试剂：

基因组DNA 500 ng～1μg

引物（AML1外显子3-8）F(10μM) 1μl引物（AML1外显子3-8）R(10μM) 1μl 10×PCR Buffer 5μl

dNTP(2.5mM each) 5μl

MgCl2(1.5mM) 3μl

Taq DNA polymerase 2μl

去离子水up to 50μl

离心数秒混匀，置PCR仪上。扩增条件：95℃5 min，95℃30 sec，退火30 sec，72℃45 sec，35个循环，最后72℃延伸10 min。退火温度根据各个外显子的引物不同而不同。扩增产物直接送上海生物工程有限公司测序。出现有突变测序结果则重复一次。

## **2.8** **RT-PCR**检测**MDM4-S/MDM4-FL**的相对表达量

应用Primer Premier 5软件分别设计*MDM4*基因半定量引物，上游引物位于exon 3，下游引物位于exon 8上，该对引物可同时扩增*MDM4-FL*和*MDM4-S*两个剪接体，具体序列见表2-1。

50μl体系中加入下列试剂：

cDNA 2μl

MDM4-F F(10μM) 1μl

MDM4-F R(10μM) 1μl

10×PCR Buffer 5μl

dNTP(2.5mM each) 5μl

MgCl2(1.5mM) 3μl

Taq DNA polymerase 2μl

去离子水up to 50μl

离心数秒混匀，置PCR仪上。扩增条件：95℃5 min，95℃30 sec，52℃30 sec，72℃1 min，35个循环，最后72℃延伸10 min. ABL基因作为内参，取10μl PCR产物经2%琼脂糖凝胶（含EB）电泳，用凝胶成像分析系统对电泳结果进行扫描分析，对各扩增条带进行灰度扫描。所有的样本做复孔减少误差。

## **2.9** 实时定量**RT-PCR** 检测复杂核型和正常核型患者**MDM2**、**MDM4-FL** 和

**MDM4-S的表达量，ABL基因为内参。**

（1）引物设计：引物序列如下，MDM4FL/S二者共用上游引物MDM4-FLq-F。

MDM2q-F: 5'-CAAAGAAAACGCCACAAATC-3' MDM2q-R: 5'-CTGAAACTGAATCCTGATCCAAC-3' MDM4-FLq-F: 5’-CAGCAGGTGCGCAAGGTGAA-3'

MDM4-FLq-R: 5'-CTGTG CGAGA GCGAG AGTCTG-3' MDM4-Sq-R: 5'-GCACTTTGCTGTAGTAGCAGTG-3 ABL-F: 5'-GAGTTCATGACCTAC GGGAACCT-3' ABL-R: 5'-GGTACTCCATGGCTGACGAGAT-3'

（2）总RNA提取及逆转录反应，具体操作同第一部分。

（3）Real-time RT-PCR体系配制：

SYBR Premix Ex Taq(Tli RNaseH Plus)(2×) 12.5 μl PCR forward primer(10μM) 0.5 μl

PCR reverse primer(10μM) 0.5μl

cDNA 模板 2.0 μl

去离子 H2O 9.5 μl

Total 25 μl

PCR反应条件：预变性95℃10s，变性95℃15s，退火60℃30s，72℃30s，共40个循环，72℃延伸10min。

## **2.10** 统计学处理

采用Image J软件对RT-PCR产物电泳条带灰度值进行扫描，以*MDM4S* 或

*MDM4FL* 片段的灰度值/ABL 的灰度值作为两个片段的相对表达量， 以

（*MDM4S*+*MDM4FL*）灰度值/ABL灰度值作为*MDM4*总（*MDM4-*total）相对表达量。以两组MDM4S/MDM4FL相对表达量比值和MDM4S/MDM4-total相对表达量比值为统计量，采用SPSS11.5统计软件进行两均数比较的t检验，*FLT*3-ITD阳性率采用卡方检验比较两组的差异。*P*<0.05认为有统计学意义。

用△Ct（Ct实验组－CtABL）法处理实时荧光定量RT-PCR所得的Ct数据，采用SPSS 11.5软件处理获得的数据，符合正态分布用两组均数比较的t检验，方差不齐用t’检验，实验组标本△Ct值不符合正态分布，以2个独立样本的秩和检验(MannWhitney U检验)进行统计分析；*P*<0.05认为有统计学意义。

结果

### **1.** 相关基因突变检测

**（1）*TP53*基因突变检测**

*TP53*基因cDNA水平exon3-exon9和基因组DNA水平exon4-exon11各个外显子的测序结果未见碱基替换、缺失及插入等突变。图2-1和图2-2是部分测序图。

图2-1显示15例CK-AML患者*TP53*基因cDNA水平exon3-exon9部分测序图，图2-2显示15例患者在DNA水平分别检测*TP53*基因exon4～exon11突变情况部分测序图。结果显示，15例患者在cDNA水平和DNA水平均未发现有点突变、错义突变、缺失、插入及移码突变等。

**（2）FISH检测*TP53*基因缺失**

15例复杂核型患者中有2例为*TP*53缺失一个拷贝。其余可见两个完整的

*TP*53信号（图2-3）。

**（3) *FLT*3-*ITD*(FLT3 internal tandem duplication, *FLT*3-*ITD*)突变检测**

基因组DNA PCR检测*FLT*3基因exon14和exon15的ITD，10μl PCR产物用10%聚丙烯酰胺凝胶电泳，硝酸银染色，部分结果见图2-4.15例复杂核型

AML患者中有3例*FLT*3-*ITD*为阳性，同时检测了正常核型AML患者*FLT3-ITD*，阳性率为23.6%，图2-4显示了15例（line1～15）复杂核型AML和部分正常核型AML患者（line16～20）检测结果。正常核型组和CK-AML组*FLT3-ITD*阳性率比较采用2检验，*P*＞0.05，两组之间*FLT3-ITD*阳性率无统计学差异（表2-2）。

Table 2-2 The Positive Rate of FLT3-ITD in Two Groups

| group | FLT3-ITD(+) | FLT3-ITD(-) | total | Positive rate(%) | P |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| CK | 3 | 12 | 15 | 20 |  |
| NK | 29 | 96 | 125 | 23.2 | 0.7803# |
| **total** | 32 | 108 | 140 | 22.8 |  |

注：#*P*＞0.05；CK: complex karyotype; NK: normal karyotype



图 2-1 *TP*53 cDNA水平测序结果（部分），15例患者未见点突变、缺失及插入等突变



图2-2 *TP*53各外显子测序结果，exon7箭头表示多态位点(C/T和G/T)



图2-3部分患者骨髓细胞*TP*53 FISH结果。A.细胞核内有两个绿色信号表示有两个拷贝*TP*53基因；B.部分细胞核中只有一个绿色信号，表示缺失一个拷贝*TP*53基因。



图2-4 15例CK-AML和部分正常核型AML *FLT3-ITD*检测结果。1-15表示15例CK-AML

*FLT3-ITD*有3例阳性，16-20为部分正常核型AML检测结果。M为DL1000 DNA Marker.

**（4）*AML1*基因突变检测**



图 2-5 *AML1*各个外显子测序图（部分）

*AML1*基因组DNA水平exon3-exon8各个外显子扩增，产物经生工生物公司测序，图2-5是部分测序图。测序结果exon3-exon8未见有点突变、缺失及插入突变等。

### **2.** **RT-PCR**检测**MDM4-S/MDM4-FL**的相对表达量

## **2.1** 线性扩增循环数的确定

取模版cDNA 1μl，扩增条件为：95℃预变性2min，95℃变性30s，退火

30s，72℃延伸45s，循环数依次为18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、

38时各取出1管，最后每管均72℃延伸10 min.2%琼脂糖凝胶电泳，确定内参基因ABL和目的基因*MDM4-FL*及*MDM4-S*最佳线性扩增循环数。

（1）*MDM4FL*/*S*最佳循环数测定

图2-6 显示上述每个循环周期取5μl 产物电泳图。从图中可以看出，

*MDM4FL/S*在32个循环时达到平台期，所以确定该基因的最佳循环数为32个。



图 2-6 *MDM4FL/S*最佳循环数测定

（2）*ABL*最佳循环数测定



图 2-7 *ABL*最佳循环数测定

图2-7显示上述每个循环周期取5μl产物电泳图，从图中可以看出，*ABL*基因扩增在28个循环时达到平台期，所以确定其最佳循环数是28个。

## **2.2** **CK-AML**及**NK-AML**患者***MDM4-FL*/*MDM4-S***两种剪接体相对表达量比

**较。**

按本研究设计的引物位点，两种剪接体大小分别为：*MDM4-FL*: 536bp，

*MDM4-S*: 468bp. 全部15 例复杂核型和部分正常核型AML 患 者

*MDM4-FL*/*MDM4-S*及内参*ABL* RT-PCR检测结果如图2-8示。



图2-8复杂核型AML与正常核型AML *MDM4-S*及*MDM4-FL*表达量。A图为部分正常核型AML患者*MDM4S/MDM4FL*表达量。B图为15例复杂核型患者*MDM4S/MDM4 FL*表达量。对应的下方115bp条带为内参ABL表达量，M表示DL1000 marker.

采用Image J软件对PCR产物电泳条带灰度值进行扫描，以*MDM4S* 或

*MDM4FL* 片段的灰度值/ABL 的灰度值为两个片段的相对表达量， 以

（*MDM4S*+*MDM4FL*）灰度值/ABL灰度值为MDM4总（*MDM4-*total）相对表达量。以两组MDM4S/MDM4FL相对表达量比值和MDM4S/MDM4-total相对表达量比值为统计量，15例复杂核型患者和125例正常核型患者结果见表2-5。经统计学分析，复杂核型组*MDM4-S/MDM4-FL*比值高于正常核型组，差异具有统

计学意义（*P*＜0.05）；复杂核型组*MDM4-S/MDM4-*total比值高于正常核型组，

差异具有统计学意义（*P*＜0.05）；此外对CK-AML组与NK-AML组的年龄进行了统计分析，两组差异没有统计学意义(*P*＞0.05)（见表2-3）。

表 2-3 CK-AML和NK-AML年龄及MDM4-S表达量比较

**年龄**

**分组**例数

**(** *x***±s)**

*MDM4S*/*MDM4FL*

*P*

**（***x*±s**）**

*MDM4S*/*MDM4-*total

*P*  *P*

**（***x*±s**）**

CK-AML 15 53.8 ±

17.4

NK-AML 125 49.0 ±

0.317#

0.8390±0.7595\* 0.4029±0.1507\*

0.047

0.4099±0.1037

0.010

17.5

注：#*P*＞0.05，\**P*＜0.05

0.2860±0.0550

# **3.** 实时定量**RT-PCR**检测***MDM2***、***MDM4-FL***和***MDM4-S***的表达量

## **3.1** 实时定量**RT-PCR**溶解曲线

三个基因扩增曲线和溶解曲线见图2-9。溶解曲线呈单峰，提示扩增产物具有特异性。



图 2-9 MDM2, MDM4FL, MDM4S及内参ABL基因的扩增曲线和溶解曲线

## **3.2** 电泳分析***MDM2***、***MDM4FL***及***MDM4S* PCR**产物的特异性

取三个基因定量PCR产物各5μl，2%琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像可见扩增结果为一条特异的条带，提示扩增过程中引物与模板发生特异性结合并扩增。如图2-10所示。



图 2-10 电泳分析PCR产物的特异性

## **3.3** 各基因**mRNA**相对表达量

用ΔCt= Ct实验组－CtABL法处理实时定量RT-PCR所得的Ct数据，计算各基因mRNA相对表达量，以*ABL*作为内参。取每个标本每基因的3次ΔCt平均值，计算各基因相对内参的表达量（表2-4）。

表 2-4 *MDM4FL、MDM4S、MDM2*及*ABL*相对表达量

| GENE | ΔCt 均数±标准差（ x ±s）  CK-AML NK-AML | | t’ | t'0.05 | P |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| MDM2 | 1.2325±2.1717 | -0.5136 ±1.3782 | 1.2996 a | 2.1371 | ＞0.05 # |
| MDM4FL | 3.1300±2.5527 | 0.5882±1.2384 | 3.8031 a | 2.1402 | ＜0.05\* |

*MDM4S* 6.1920±3.4192 1.7160±2.9743 T=391.000 b 0.0001\*

注：#*P*＞0.05，\**P*＜0.05，a表示方差不齐，采用t’检验结果，b表示秩和检验结果

分别计算15例复杂核型患者和125例正常核型患者*MDM2*、*MDM4FL* 和

*MDM4S*的ΔCt值（即相对表达量），经统计学分析，复杂核型组与正常核型组相比，*MDM2*表达水平无差异，复杂核型组*MDM4-FL*和*MDM4-S*相对表达量高于正常核型组，差异具有统计学意义（见表2-4）。

讨论

**1. p53通路及其调节**

*TP53*基因突变涉及到大约50%～70%的人类恶性肿瘤，主要见于实体瘤中，在血液系统肿瘤中发生率较低。*TP53*基因最初被认为编码一种分子量为53 kDa的蛋白质而得名，是一种抑癌基因。其表达产物为基因调节蛋白即P53蛋白，

DNA受损后，P53可参与DNA的修复过程；在细胞周期中，P53的调节功能主要体现在G1/S和纺锤体组装检测点的监测，与转录激活作用密切相关。

P53信号通路：P53在调控细胞周期和DNA复制和凋亡中起重要作用，也是非常有吸引力的肿瘤治疗的靶点之一。P53受多种信号分子的调控。例如ATM和ATR、CHK2、MDM2和MDM4等，其中MDM2和MDM4是P53主要的负性调控因子（图2-11）。



图 2-11 P53信号通路[24]

Popowicz GM [24]等研究认为50%人类肿瘤中存在由于突变造成的P53功能丧失，其余的保留野生型P53的患者，由于与MDM2和MDM4蛋白相互作用，导致P53通路失活，MDM2和MDM4被认为是主要的P53抑制因子。MDM2通过其N端的100aa与P53 N端转录活性结构域相互作用，在蛋白酶体中通过泛素化降解P53，并通过负反馈机制使得P53保持在适当的水平。MDM4是最近发现的可独立调节P53的基因，通过其N端P53结合结构域与P53结合，封闭其转录活性结构域，并不引起P53的降解，对于P53的抑制作用甚至较MDM2强。Harutyunyan A[25]等分析了330例MPN，有22例转为AML。22例中1q（包

括MDM4基因)扩增占18.18%(4例)，6例具有*TP53*突变，二者占其中的45.5%

（10/22）。实验证据表明这10例患者是由于*TP53*突变或1q扩增引起P53缺陷导致MPN向AML转化。作者还检测了在其他研究中报道与MPN转为AML有关其他基因：*IDH1*，*IDH2*, *LNK*等，结果22例中，检出*IDH1*, *IDH2*突变各1例，未检出*LNK*突变。该研究证实TP53突变和1q扩增与MPN转化为AML的相关性最高。

**2. 复杂核型的形成机制研究**

复杂核型是指细胞遗传学检测至少3种互不相关的细胞遗传学异常者，不包括t(8;21), t(15; 17)，inv（16）或t(16;16)等具有较好预后的染色体畸变。由于伴复杂核型的AML治疗缓解率低，预后较差，因此复杂核型形成的机制是目前研究的热点问题。复杂核型尤其是伴有单体型核型被认为是急性髓系白血病独立的预后不良的因素[26]。Haferlach C[27]等对107例CK-AML和235例AML的*TP53*基因突变进行检测，结果发现107例CK-AML 57例丢失*TP53*等位基因，保留的等位基因中有50例发生突变，50例未丢失*TP53*等位基因中，33例发生突变，因此总突变率为78%。235例AML患者中总*TP53*突变：33/235(14%)，其中

CK为29/42（69%），正常核型为4/193(2.1%)，正常核型中*TP53*突变率低。**该**

**研究提示*TP53*突变与复杂核型形成具有显著的相关性**。*FLT*3-ITD(+)也被认为是预后差的分子标记，我们对两组患者进行了检测，结果显示两组差异并无统

计学意义。*AML1*作为重要的转录因子最初在MDS、放疗或化疗转为白血病的患者中发现点突变，后来发现在细胞遗传学异常的白血病患者中发生率达到

6%～33%[28]，是预后不良的因素之一。本实验中我们对15例CK-AML患者*AML1*

各个外显子PCR产物测序，未检测出突变。

*TP53*基因各个外显子也未检测出突变，FISH检测15例CK-AML中2例发生*TP53*丢失。所以在15例CK-AML中，未检测到*TP53*突变，有两例13%(2/15)丢失一个拷贝，突变率较文献报道低，可能是由于病例数过少，还有检测方法的局限性造成的。

为了阐明急性髓系白血病中复杂核型发生的机制，2012 年，Rucker FG[19]

等分析了234例伴复杂核型的AML患者的*TP53*的突变情况，结果显示CK-AML中*TP53*突变率为70%，**说明*TP53*基因异常在复杂核型形成中起着重要的作用**。CK-AML中P53突变率为70%，那么剩余的30%包含野生型P53的AML患者，

其复杂核型形成的机制又是如何？Medeiros BC[17]在对上述文献的评论中，指出

Rucker等的工作非常有意义，正在开始揭开急性髓系白血病复杂核型发生的分子机制，但是还有一些问题需要解决，比如大约占30%的具有野生型P53的复杂核型急性髓系白血病中，复杂核型的发生是否是由于P53 的负性调控基因

MDM2或MDM4及MDM4-S的作用引起？

在这部分研究中，我们重点检测了患者*TP53*基因及其它相关基因的突变、

*MDM2*、*MDM4*及其剪接体*MDM4-S*的表达水平等，分析各种相关基因的突变以及*MDM4-S/MDM4-FL* 比值的变化，发现在复杂核型AML 患者中，

*MDM4S/MDM4FL*比值升高，与正常核型AML相比具有显著差异。那么是否*MDM4-S/MDM4-FL*比值升高与复杂核型形成有关，进而影响AML患者预后？这些问题需要进一步探讨。

MDM4S升高是否会引起以及通过何种机制导致非整倍性形成？在细胞周期进程中，是否是通过抑制纺锤体检查点，导致非整倍性的形成？在下一部分，我们将构建慢病毒载体，在表达野生型P53的细胞中过表达*MDM4S*，即提高*MDM4-S/MDM4-FL*比值，检测细胞周期中纺锤体检查点相关蛋白的表达水平，从而初步阐明复杂核型形成的可能机制。

第三部分*MDM2*、*MDM4-S*基因慢病毒载体的构建与感染

前言

在血液病的研究中，大样本的复杂核型*TP53*基因突变研究表明[19]，在伴复杂核型的AML中，有70%发生*TP53*基因突变。表达野生型P53的CK-AML患者中，其发生机制可能是由于P53的活性受到其他蛋白的调控，造成功能低下。在P53调控因素中，MDM2和MDM4是最重要的负性调控因子。MDM2与P53结合，将P53蛋白从细胞核运输到胞浆中，在胞浆中使之泛素化降解，从而抑制P53的转录活性。MDM4是MDM2相关蛋白，最初是从小鼠表达文库中分离出来的与P53相互作用的蛋白，人类的同源基因MDM4在1997年[29]被鉴定并且迅速引起广泛的重视和研究[30]。MDM4通过与P53结合，封闭其转录活性结构域，从而抑制P53的功能，并不引起P53的降解[31]。

*MDM4*基因定位于1q32，编码含490aa的蛋白质，其功能结构域从N端到

C端依次为P53结合结构域、酸性结构域、锌指结构、RING结构域。*MDM4*基因转录后形成多种剪接体，最重要的有6种，*MDM4-S*、*MDM4-211*、*MDM4-A*、*MDM4-G*、*MDM4-Altl*、*MDM4-Alt2*。其中*MDM4-S*由于exon 6缺失，使得翻译

在exon 7上提前终止，形成截短的MDM4-S蛋白，只保留了P53结合结构域，

MDM4-S蛋白较MDM4全长蛋白（MDM4-FL）更有效抑制P53功能[22]。

在我们前期的研究中，15例伴复杂核型初发AML患者*TP53*检测只有2例缺失一个拷贝，未发现点突变。对*MDM4*半定量及定量研究中，发现*MDM4S*在复杂核型组表达升高，使得*MDM4S/MDM4FL*比值在复杂核型组高于正常核型组，二者差别具有统计学意义。为了进一步了解*HDM4-S* 高表达及

*MDM4S/MDM4FL*比值升高对P53通路的影响及其对复杂核型的形成的作用，我们构建了*MDM2*、*MDM4-S*慢病毒载体，感染表达野生型P53的HepG2细胞株，通过检测细胞增殖及相关蛋白的表达变化，了解MDM4-P53通路上关键分子的变化规律，从而进一步阐明MDM4-S在复杂核型形成中的作用。

材料和方法

# **1.** 实验材料

## **1.1** 质粒、菌株与细胞株

pEASY-T5 Zero Transgen 公司 中国 pCDH1-MCS1-EF1-copGFP 慢病毒载体 Biosciences 公司，U. S. A包装质粒 Biosciences 公司，U. S. A

293T中国科学院上海细胞库

HepG2细胞株本实验室保存

## **1.2** 主要仪器

HERA cell 150 CO2培养箱Heraeus, Germany

DYY-7C 型电泳仪 北京六一仪器厂，中国

THZ-D台式恒温振荡培养箱江苏太仓实验设备厂，中国

CA950-2超净工作台上海净化仪器厂，中国其余仪器同前

## **1.3** 主要试剂

琼脂粉Sigma，U. S. A

氨苄青霉素TIANGEN，中国

限制性内切酶（*BamH*Ⅰ，*EcoR*Ⅰ） TakaRa，Japan T4 DNA 连接酶及缓冲液 TakaRa，Japan

1kb DNA ladder marker TakaRa, Japan TransStart FastPfu DNA Polymerase Transgen 公 司 中国 Competent Cell Transgen 公司 中国

Taq DNA聚合酶Fermentas, Canada

Polybrene Sigma, U. S. A

凝胶回收试剂盒OMEGA，U. S. A

去内毒素质粒提取试剂OMEGA，U. S. A

DMEM高糖培养基武汉博士德，中国

DAPI Sigma, U. S. A

其余试剂同第一部分

## **1.4** 部分试剂的配制

(1) **Amp(+)的半固体LB培养板**：胰蛋白胨2 g，酵母提取物1g, NaCl 2 g，琼脂粉3g，溶于200ml去离子水中高温高压灭菌，置超净台上，待温度降低至50℃左右时加入100 mg/ml氨苄青霉素200μl，混匀，倒板，冷却后，用封口膜密封，4℃保存。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **(2)** STE |  | |
| 1M | TrisHCl | 3ml |
| 3M | NaCl | 10ml |
| 0.1M | EDTA | 3ml |

H2O 284ml混匀即可

# **2.** 实验方法

## **2.1** ***MDM2***、***MDM4S***慢病毒载体的构建

### **2.1.1** ***MDM2***、***MDM4S***基因**CDS**区表达引物的设计



图 3-1 慢病毒载体的结构图

从Gene Bank检索*MDM2*、*MDM4S*基因全长CDS区序列，参考序列：

*MDM2* Gene ID:4193/NM\_002392.4; *MDM4* Gene ID:4194, *MDM4-S*

NR\_024171.2.

使用Primer Premier5.0软件设计引物，根据软件分析两个基因cDNA区酶切位点及图3-1中pCDH1-MCS1-EF1-copGFP载体的多克隆位点的酶切位点，设计引物外侧单一酶切位点，两个基因引物序列如下，由上海生物工程有限公司及北京奥科生物技术公司合成，下划线部分为酶切位点。

MDM2-F 5'CCG**GAATTC**GCCACCATGGTGAGGAGCAGGCAAAT 3' (*EcoR*Ⅰ) MDM2-R 5' CGC**GGATCC** CTAGGGGAAATAAGTTAGCACAATC 3' (*BamH*Ⅰ) MDM4-S-F 5'-CCG**GAATTC**GCCACCATGACATCATTTTCCACCTC-3' (*EcoR*Ⅰ) MDM4-S-R 5'-CGC **GGATCC** TTATGCTCTGAGGTAGGCAG - 3'(*BamH*Ⅰ)

### **2.1.2** ***MDM2***、***MDM4S***基因**CDS**区扩增

提取总数约5～6×105个K562细胞的Total RNA，逆转录（步骤同第一部分）。得到的cDNA模板采用TransStart FastPfu DNA Polymerase扩增三个基因的CDS区。

50μl反应体系依次加入下列试剂：

5×buffer 10μl

dNTP Mix(2.5mM) 4μl

Forward Primer(10μM) 1μl

Reverse Primer(10μM) 1μl TransStart FastPfu DNA Polymerase 1μl cDNA 2μl

ddH2O 31μl

Total volume 50μl

反应条件：95℃2 min，95℃30s，52℃58℃30 s，72℃1.5 min, 35个循环，

72℃延伸10 min。

### **2.1.3** **PCR**产物电泳及回收

将扩增的总100μl PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳，150V，20min，将目的条带在紫外灯下切胶，装入1.5ml离心管中。称重计算胶的体积：1mg=100μl。

采用OMEGA凝胶回收试剂盒回收片段，具体操作如下：

（1）向胶块中加入等倍凝胶体积的XP2溶液，把混合物置于55℃~65℃水浴中温浴7min，或至凝胶完全融化，期间每隔2-3分钟混匀一次。

（2）取HiBindDNA柱子装在试剂盒提供的2ml收集管内。将融化的DNA-琼脂糖-XP2溶液移入HiBindTM DNA柱子中。室温下，离心，10000×g，1 min，弃流出液。

（3）柱子中加入300μl XP2溶液，室温下，离心，10000×g，1 min，弃留出液。

（4）将柱子重新放回空收集管中，离心，≥13000×g，2 min 干燥柱子。

（5）将柱子放在新的1.5ml离心管上，在柱子中加入20μl去离子水，室温静置2 min溶解DNA，离心，13000×g，l min洗脱DNA。取2μl经1%琼脂糖电泳后定量，标记后置于-20℃保存。

### **2.1.4** **pCDH1-MCS1-EF1-copGFP**和目的片段双酶切和连结

**（1）MDM2/MDM4S/ pCDH1质粒双酶切：**

酶切体系20μl：

MDM2/MDM4S片段16μl

10×K buffer 2 μl

*EcoR*Ⅰ 1 μl

*BamH*Ⅰ 1 μl

Total 20 μl

短暂离心混匀，37℃水浴中过夜（12 h～16 h）pCDH1 10μl

10×K buffer 2 μl

*EcoR*Ⅰ 1 μl

*BamH*Ⅰ 1 μl

去离子 H2O 6 μl

Total 20μl

短暂离心混匀，37℃水浴中过夜（12 h～16 h）

酶切后电泳鉴定是否酶切完全并定量，用OMEGA胶回收试剂盒纯化后，再取1μl～2μl电泳定量，-20℃保存。

**（2）双酶切产物连结：10μl体系**

MDM2/MDM4FL/MDM4SDNA片段7μl (0.3 pmol)

pCDH1双酶切产物1μl (0.03 pmol)

T4 DNA ligase 1μl

10×T4连结Buffer 1μl

Total 10μl

短暂离心混匀，16℃低温水浴中过夜（12h～16h）。

### **2.1.5** 转化

将连接产物分别转化Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell，步骤如下：

（1）取100μl Trans1-T1 Phage Resistant Chemically感受态细胞，冰上解冻，分装为50μl/管，取连结产物4.8μl加入到50μl感受态中，冰上放置30 min。

（2）42℃热激30 sec，迅速置冰上2 min～3 min。

（3）每管中加入预热至室温的无抗性LB培养基200μl，轻轻混匀，置摇床中，37℃，200 rpm，1h，使细菌复苏。

### **2.1.6** 涂板

吸取复苏的培养液置Amp(+)的半固体LB培养平板上，无菌台上仔细涂抹均匀，置37℃培养箱中，先正置培养待液体吸收后，再倒置培养过夜（12 h～16 h）。

### **2.1.7** 挑取单菌落，培养

在超净台上用消毒小枪头挑取单个菌落放入含100μg/ml氨苄青霉素的2 ml

LB摇菌管中，每个平板挑取8个单菌落，置摇床中，37℃，260 rpm，过夜培养。

### **2.1.8** 质粒抽提

（1）取过夜培养的菌液700μl，离心，12000 rpm，1min，弃去上清。

（2）细菌沉淀加入400μl STE溶液混匀，12000 rpm，离心1min，弃去上

清。

（3）加入溶液Ⅰ（含有100μg/ml的RNAse A）100μl，混匀，漩涡振荡器

振荡10 sec，加入溶液Ⅱ200μl，轻柔颠倒混匀，4℃放置3 min～5 min，逐滴加入150μl溶液Ⅲ，轻轻颠倒混匀，可见白色粘稠物出现，4℃放置3 min～5 min，离心，4℃，12000 rpm, 5 min。

（4）取上清置新离心管中，加入等量酚：氯仿，混匀，离心，4℃，12000 rpm, 5 min。

（5）取上清置新离心管中，加入等量氯仿，混匀，离心，4℃，12000 rpm, 5 min。

（6）取上清置新离心管中，加入2.5倍体积无水乙醇，轻轻混匀，-20℃沉淀1h。离心，4℃，12000 rpm, 5 min。

（7）弃上清，加入200μl～500μl 70%乙醇，洗一次，离心，4℃，12000 rpm, 5 min。沉淀干燥后加入20μl去离子水溶解。

### **2.1.9** 酶切鉴定

MDM2(orMDM4-S)重组质粒双酶切鉴定，20μl体系如下：

MDM2(or MDM4-S) 16μl

10×Kbuffer 2μl

EcoRⅠ1μl

BamHⅠ1μl

短暂离心混匀，37℃水浴中过夜（12 h～16 h），1%琼脂糖电泳观察。

经过上述双酶切的产物电泳后具有相应大小条带的克隆送测序鉴定。含正确克隆的菌液加入终浓度为15%的灭菌甘油，混匀，-70℃保存。

### **2.1.10** 高纯度去内毒素**pCDH1**质粒提取

采用OMEGA去内毒素质粒提取试剂盒提取高纯度质粒，按照质粒提取试

剂盒说明书，具体操作如下：

（1）取50 ml LB置灭菌三角烧瓶中，加入50μl 100 mg/ml Amp，混匀，加入含正确克隆的菌液100μl，置摇床中，37℃，260 rpm，摇菌过夜（12 h～16 h）。

（2）取15 ml过夜培养的菌液，离心，室温，5000×g，10 min，弃上清。

（3）沉淀中加入500μl SolutionⅠ/RNase A混和液，漩涡振荡使细胞完全重新悬浮。

（4）将悬液转移至1.5 ml离心管中，加入500μl SolutionⅡ，轻轻颠倒混匀7-10 次。

（5）加入250μl预冷的Buffer N3，轻柔上下颠倒混匀，可见形成白色絮状沉淀。离心，4℃，12000×g，10 min。

（6）小心将上清转移至新的1.5 ml离心管中，加入1/10体积的ETR溶液至上清液中，轻轻颠倒混匀，冰上放置10 min，每隔2 min～3 min轻轻颠倒混匀一次。

（7）42℃水浴5 min，离心，25℃，12000×g，3 min。将上清转移至新的1.5

ml离心管中，加入1/2体积无水乙醇，轻轻上下颠倒混匀2～3次，室温下孵育

1 min～2 min。

（8）将HiBind Mini Columns 装于2 ml 收集管上，每次吸上述混合液700μl

转移至柱子内，于室温下离心，10000×g，1min，使混合液完全流过柱子。

（9）柱子中加入500μl Buffer HB，离心，室温下10000×g，1 min。弃去流出液。

（10）柱子中加入700μl DNA Wash Buffer，离心，室温下，10000×g，1 min。弃去流出液。重复一次。

（11）将柱子加入空的2 ml收集管，离心，13000×g，3 min，干燥柱子。

（12）将柱子加入到新的1.5ml离心管中，加入100μl Endotoxin-Free Elution

Buffer，室温孵育2 min，离心，13000×g，1 min，洗脱DNA。

（13）电泳定量，-20℃保存。

## **2.2** 包装病毒

采用磷酸钙共沉淀法转染293T细胞，将空载体pCDH1-MCS1-EF1-cop

GFP、构建成功的pCDH1-MDM2、pCDH1-MDM4-S分别与包装辅助质粒pPACKH1- GAG, pPACKH1-REV和pVSV-G共转染293T细胞，包装病毒颗粒，具体操作如下：

### **2.2.1** 慢病毒的包装

（1）转染前24h，将传代次数少且处于对数生长期的293T细胞，调整细胞密度为1×106细胞，重新接种于25cm细胞培养瓶内，加入含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基，37℃，5% CO2培养箱内培养。24 h 待细胞融合达50%～

60% 时即可用于转染。

（2）转染前换液，10cm的培养板中加入20μg质粒，其中pCDH1-MDM2

或pCDH1- MDM4-S 10μg，辅助质粒共10μg，三个辅助质粒比值为3: 1: 1.

（3）取CaCl2 600μl置小试管中，依次加入pCDH1-MDM2或pCDH1-MDM4

-S及辅助质粒，吹打混匀，逐滴加到600μl BBS中，边加边振荡，振荡器上振荡10 sec，室温下孵育20 min，吹打混匀，缓慢逐滴加入293T细胞培养液中。置37℃，5% CO2培养箱中培养。转染12小时后更换新鲜完全培养液，后放入培养箱继续培养。待48小时及72小时荧光显微镜下观察转染效果。

### **2.2.2** 病毒的收获及浓缩

（1）在转染后48 h和72 h分别收获293T细胞上清液。离心，4℃，4000×g，

10 min，除去细胞碎片。

（2）收集上清液，离心，4℃，50000×g，90 min，弃上清。

（3）用原上清1/10的体积无血清DMEM重悬病毒沉淀，分装后置-80℃长期保存。取其中一支进行病毒生物学滴度测定。

### **2.2.3** 慢病毒滴度的测定

（1）测定前一天，将2×104 293T细胞接种于94孔培养板中，加入含10%

血清的DMEM高糖培养基100μl，37℃，5% CO2培养箱内培养。

（2）两个病毒各准备8个1.5 ml EP管，每个管中加入90μl无血清DMEM培养基，取待测病毒原液10μl加入第一个管中，混匀后，取10μl加入到第二个管中，依次处理至最后一管。

（3）每个病毒选8个细胞孔，吸弃90μl培养基，按梯度依次加入90μl稀释好的病毒溶液，放入培养箱培养。

（4）24 h后，加入完全培养基100μl，继续培养4 d，荧光显微镜下观察荧光表达情况。以最后一个能观察到荧光的孔为计数孔，分别计算各病毒的MOI值。公式：病毒滴度=最后一孔荧光细胞数×103/稀释倍数，MOI值为具有感染能力的病毒颗粒数目。

### **2.2.4** 慢病毒感染**HepG2**细胞系及稳定转染细胞克隆的筛选

（1）将处于生长对数期的HepG2细胞接种于24孔培养板，加入含有10%

小牛血清的DMEM培养基，置于37℃，5% CO2培养箱内培养。

（2）24 h后进行感染，待细胞达到50%～70%融合时进行感染，以Mol=100

加入以无血清DMEM稀释至500μl的病毒液置于培养箱培养过夜。

（3）小心吸弃上清，加入含10%血清的新鲜DMEM培养液，重悬细胞后继续培养48 h。

（4）用荧光显微镜观察HepG2细胞绿色荧光表达情况。

（5）根据细胞生长状态，给予传代或换液处理，继续培养48 h。

（6）荧光显微镜下观察GFP阳性率。

结果

**1. 用表达引物扩增两个片段，电泳结果**

****

图 3-2 目的基因PCR产物电泳结果，M表示DL 1000 DNA Marker

**2. MDM2、MDM4S扩增产物和pCDH1质粒酶切**



图3-3 酶切后电泳图

M1为1kb DNA Marker, M2表示DL1000 DNA Marker,1a为pCDH1质粒双酶切前，1b为质粒双酶切后，2为MDM4S扩增产物双酶切后片段，3为MDM2扩增产物双酶切后片段

**3.菌液小提质粒酶切鉴定**



图 3-4 菌液小提质粒酶切鉴定。M1为2500 DNA marker，M2为1kb DNA ladder marker

从图3-4中可以看出，挑取菌落摇菌后，取700μl提质粒，双酶切过夜，电泳后可见pCDH1-MDM4S line4无目的条带，pCDH1-MDM2 line5没有目的条带，其余均有450bp或者1500bp目的条带，取其中阳性者送测序鉴定。

**4. 克隆测序图**：MDM2、MDM4S序列与GeneBank中序列一致，读码框未发生

移位。图3-5示pCDH1-MDM2、pCDH1-MDM4S部分测序图。



图3-5 构建的病毒载体测序图。A为pCDH1-MDM4S部分测序图,

B为pCDH1-MDM2部分测序图。

**5．提取质粒电泳定量，MDM4S为200 ng/μl，MDM2为50 ng/μl(图3-6)：**

****

图3-6 质粒定量，M为1kb Marker，1为MDM4S，2为MDM2

**6. pCDH1、pCDH1-MDM4-S、pCDH1-MDM2及辅助质粒共转染293T细胞48h，荧光显微镜观察转染效率，结果见图3-7.**



图 3-7 pCDH1、pCDH1-MDM4-S、pCDH1-MDM2转染293T转染效率

**7. 激光共聚焦显微镜观察感染率。**



图 3-8 病毒感染HepG2细胞48h荧光显微镜下观察感染效率

HepG2细胞的感染率达到60%～80%，可以达到后续实验的要求（图3-8）。

讨论

**1. 模板的选择**

在构建载体的过程中，模板的选择很重要，目的基因表达量要高，且本身没有突变。由于本研究中*MDM4-FL*和*MDM4-S*只相差68bp，大多数患者*MDM4-S*表达量低，因此我们选择了*MDM4-FL*和*MDM4-S*表达量大致相同的

K562细胞株作为模板进行目的基因的扩增。其次，由于构建表达载体引物受到起始密码和终止密码附近序列的限制，直接用设计的加酶切位点和保护碱基的引物进行扩增往往扩增不出条带，所以在起始及终止密码外侧设计特异性较好的引物做第一轮扩增，扩增产物作为模板，用加酶切位点和保护碱基的表达引物再进行第二轮扩增往往成功率较高。高保真酶的选择也很重要，要尽量选择保真度好，而且扩增效率高的DNA聚合酶，可节省时间，并且准确度也比较高。扩增产物切胶纯化时，尽可能减少在紫外灯下照射的时间，也是避免引起碱基突变需要注意的一点。

**2. 载体的选择**

本研究中选择慢病毒载体感染细胞，主要是由于一般的表达载体感染效率低，无法达到实验目的。选用慢病毒载体感染效率高，本实验中达到了60%以上，再经过筛选，并扩大培养，感染效率可达到80%左右，得到纯度较高的稳定转染了目的基因的细胞，这些阳性细胞可供后期基因功能的实验研究。带有目的基因的细胞可以在液氮中长期冻存，为今后的一些功能研究提供便利。

**3. 目的细胞的选择**

人肝母细胞瘤细胞系HepG2常常用来分析细胞的增殖和迁移、细胞凋亡等实验，该细胞株表达野生型P53[32], MDM4表达水平正常，MDM4-S剪接体表达水平低。由于我们的实验目的是观察是否MDM4-S通过对P53通路的抑制，导致细胞非整倍性的发生，所以选择HepG2细胞株高表达MDM4-S可以满足实验的要求。

本研究选择HepG2细胞株分别感染含有MDM2、MDM4-S片段的慢病毒载

体和不含目的片段的慢病毒载体。MDM2作为p53抑制因子，可泛素化降解P53蛋白，从而调节细胞周期，并引起细胞多倍体和非整倍体改变，研究表明，MDM2还有不依赖于P53影响细胞周期的功能[33]。在作者的研究中，将*MDM*2基因分别导入p53敲除和野生型p53小鼠的乳腺细胞，均导致小鼠乳腺癌的发生，并且癌细胞呈多倍性改变。本研究中，MDM2作为阳性对照，MDM4-S作为实验组，空载体组作为阴性对照组，目的是观察过表达MDM4-S，即提高细胞内

MDM4S/MDM4FL比值能否导致非整倍性的发生，发生的机制是否是通过抑制

P53通路的活性。

第四部分MDM4-S高表达在复杂核型形成中的作用

前言

*MDM4*基因位于1q32，包含11个外显子，10个内含子。编码490aa的蛋白，其蛋白结构域包括与P53 N端相连的P53结合结构域，特定的酸性序列结构域，锌指结构域，C端的RING（really interesting new gene）结构域。该基因有多个剪接体，其中MDM4-S是截短的MDM4蛋白，缺失exon6，在exon7上出现终止密码，导致翻译提前终止，只保留P53结合结构域[22]（图4-1）。该截短的蛋白能与P53更有效结合并抑制P53活性，是P53更有效的抑制剂[22,34-37]. MDM4是多功能蛋白，不是P53的靶基因，也不具有泛素蛋白酶活性，主要通过与P53结合，调节P53活性发挥作用。



图 4-1 MDM4基因及蛋白的结构[22]

与*TP53*突变相比，*MDM*4可变剪接体在恶性肿瘤中可作为P53信号通路活性减弱更好的生物学标记，Lenos K等[22]的研究证实在骨肉瘤中，MDM4-S/MDM4-FL比例升高，使得骨肉瘤进展并降低总生存率，结果提示：MDM4-S/MDM4-FL比例升高与MDM4全长蛋白表达降低有关，MDM4-S/MDM4-FL蛋白比例升高的同时，伴随MDM4全长蛋白水平的降低，使得MDM2蛋白表达升高，造成P53泛素化降解增多，P53信号通路失活。另

一些研究发现，在慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)中，MDM4-S mRNA高表达可作为患者预后差的分子Marker[38], MDM4的高表达则是表达野生型P53的CLL患者对化疗药物反应差的生物学Marker [39]。

复杂核型的研究多数集中在对患者预后的影响方面，我们的前期研究结果发现，15例伴复杂核型的初发AML预后均较差，与文献报道相似。有关的机制研究多数聚焦在*TP53*突变上，而且应用了DHPLC和高通量的检测方法。结果显

示*TP53*突变是独立的预后差的标志。而复杂核型伴单体型核型者*TP53*突变约占70%，正常核型*TP53*突变只占2.1%[19]，可见***TP53*突变在复杂核型形成中的重要作用**。

本课题前期应用普通PCR产物测序的方法及FISH检测了15例复杂核型的患者*TP53*突变，其中FISH检测发现2例发生缺失，并没有检测到点突变及其他突变。前面我们已经提到大约30%复杂核型患者不伴有*TP53*突变，那么这部分患者复杂核型形成的机制如何？是否与P53抑制剂MDM4/MDM2高表达有关，在这方面还没有做详细研究。在这部分的研究中，我们将构建的MDM2、MSM4-S两个慢病毒载体分别感染表达野生型P53的HepG2细胞，观察细胞周期、细胞增殖、P53通路相关蛋白表达和纺锤体相关蛋白表达的变化，从而在细胞和分子水平探讨复杂核型形成的可能机制。

材料和方法

**1. 实验材料**

## **1.1** 细胞株

稳定表达目的基因的HepG2细胞株来自第三部分

## **1.2** 主要仪器设备

HERA cell 150 CO2培养箱Heraeus, Germany

DYY-TC型电泳仪北京六一仪器厂，中国

制胶器北京六一厂，中国

垂直电泳槽北京六一仪器厂，中国

SEMI-DRY TRANSFER CELL电转仪BIO-RAD, U. S. A

其余仪器同前

## **1.3** 主要试剂

DMSO Sigma U. S. A

胎牛血清 GIBCO 澳洲

Nocodazole诺考达唑Sigma，U. S. A

Polybrene Sigma, U. S. A

DMEM培养基Hyclone，U. S. A

DAPI Sigma, U. S. A

BSA Sigma U. S. A

Rnase A Sigma U. S. A

Triton X-100 Sigma U. S. A

propidium iodide(PI)碘化丙啶 Sigma U. S. A

MTT Sigma U. S. A

Super Signal West pico化学发光底物Pierce公司，U. S. A

BAC蛋白浓度测定试剂盒武汉博士德公司，中国

预染蛋白分子量标准Fermentas，Canada

二硫苏糖醇Sigma，U. S. A

溴酚兰Sigma，U. S. A

甘油Sigma，U. S. A

四硼酸钠 (Na2B4O7 ·10H2O) Sigma U. S. A

碘化丙啶（PI） Sigma U. S. A

Tris Base上海生物工程有限公司，中国

丙烯酰胺上海生物工程有限公司，中国

甲叉双丙烯酰胺上海生物工程有限公司，中国

过硫酸氨上海生物工程有限公司，中国

TEMED上海生物工程有限公司，中国

TWEEN-20 Amresco, U. S. A

医用 X 胶片 Kodak 公司，中国

滤纸BIO-RAD，U. S. A

显影粉康为世纪公司，中国

定影粉康为世纪公司，中国

兔抗人 Securin 单克隆抗体 epitomics U. S. A

兔抗人 BubR1 多克隆抗体 bioworld U. S. A

兔抗人 P21 多克隆抗体 bioworld U. S. A

鼠抗人P53单克隆抗体武汉博士德公司，中国

鼠抗人β-actin单克隆抗体Santa cruz, U. S. A

羊抗鼠二抗（辣根过氧化物酶标记）Santa cruz, U. S. A

羊抗兔二抗（辣根过氧化物酶标记）武汉博士德公司，中国

Super Signal West pico化学发光底物Pierce公司，U. S. A

BAC蛋白浓度测定试剂盒武汉博士德公司，中国

考马斯亮兰 上海试剂总公司，中国 预染蛋白分子量标准（10-170 kDa） 武汉博士德公司，中国

其余试剂同前。

## **1.4** 主要溶液配制

（1）1×磷酸盐缓冲液(PBS) (1000ml) NaCl 8.0g

KCl 0.2g

Na2HPO412H20 2.9g

KH2PO4 0.2g

去离子水800ml

调整pH 至7.4后，再加去离子水定容至1000ml，高压灭菌，室温放置备用。

（2）细胞裂解液

Tris (PH=7.5) 25 mM

MgCl2 2 mM

KCl 50 mM

EDTA 1 mM

DTT 5 mM

PMSF 20 μg/ml

去氧胆酸钠 0.5 g

Aproptinin 20μg/ml

（3）4×溴酚兰上样缓冲液(10ml)

1.0M Tris-HCl (PH=6.8) 2.5ml

SDS 0.8g

甘油4ml

溴酚兰0.04g

β-巯基乙醇2ml

混匀后，1200rpm，5min，除去气泡，加去离子水定容于10ml。

(4) MTT(5mg/ml)

MTT 0.25g加入0.01 mol/L PBS 50ml中，避光搅拌待彻底溶解后，以

0.22μm微孔滤膜过滤，4℃保存。

（4）30%丙烯酰胺(100ml)

丙烯酰胺29.2g

N-N’亚甲双丙烯酰胺0.8g

去离子水100ml

磁力搅拌器充分搅拌至完全溶解，置于棕色瓶中，4℃避光保存。

(5) 1.5M Tris-HCl (250ml)

Tris 45.43g

去离子水200ml

完全溶解后，用浓盐酸在室温下调整pH至8.8，去离子水定容至250ml，高压灭菌，室温保存。

(6) 0.5M Tris-HCl (250ml)

Tris 15.14g

去离子水200ml

完全溶解后，用浓盐酸在室温下调整pH至6.8，去离子水定容至250ml，高压灭菌，室温保存。

（7）10%过硫酸胺(5ml)

AP 0.5g

去离子水5ml

分装后，-20℃保存。

(8) 10% SDS (100ml)

SDS（电泳级）10g

去离子水100ml

加热助溶后，滤纸过滤，调整pH至7.2，高压灭菌，室温保存。

（9）考马斯亮兰染色液(100ml)

考马斯亮兰R250 0.25g

甲醇45 ml

去离子水45 ml

冰醋酸10 ml

配制时，先将甲醇与去离子水1: 1混合，现加入冰醋酸，滤纸过滤除去颗粒，室温保存。

（10）脱色液(500ml)

甲醇150ml

冰醋酸50ml

去离子水300ml

（11）10×Tris-甘氨酸电泳缓冲液(1L)

Tris 30.3g

甘氨酸188g

SDS 10g

去离子水定容于1000ml

临用前用去离子水稀释10倍，pH=8.3

（12）半干转移缓冲液(1L)

甘氨酸 2.93g

Tris 5.8g

SDS 0.375g

甲醇 200ml

去离子水定容于1000ml

（13）5%(W/V)封闭液

脱脂奶粉0.5g

TBST缓冲液10ml

现配现用。

（14）TBST缓冲液(1L)

NaCl 8.8g

1M Tris-Hcl(PH=8.0) 20ml

Tween20 0.5ml

去离子水定容于1000ml

(15) 2N HCl/0.5 % Trition X-100

Trition X-100 0.05 ml

HCl 1.67 ml

DH2O 8.28 ml

(16) PBS/ 1 % BSA

BSA 0.1 mg 溶于10 ml PBS

(17) 0.5% Tween-20/1%BSA/PBS

Tween-20 0.05 ml

BSA 0.1 mg

PBS 9.5 ml

（18）1 mg/ml PI储存液：10 mg PI溶于10 ml 去离子H2O，4℃避光保存。

# **2.** 实验方法

## **2.1** 细胞周期检测

（1）稳定表达MDM2、MDM4S和对照组HepG2细胞培养至对数生长期，加入Nocodazole 0.1μg/ml作用18小时后，收集细胞，每个样本做3个平行样，离心，1000 rpm×5 min，弃去培养液。

（2）收集细胞后用500μl 4℃预冷的PBS洗一次，加入150μl预冷PBS悬浮细胞，之后缓慢加入350μl无水乙醇，终浓度为70%，重悬固定。轻轻混匀并放在4℃至少30 min。

（3）离心除去乙醇，用500μl PBS洗一次，加入500μl含有100μg/ml RNase

A的PBS，室温孵育30 min，离心，弃上清，细胞重悬于50μg /ml propidium

iodide(PI)中，4℃染色30 min，用300目的尼龙膜过滤细胞，流式细胞仪检测细胞DNA含量。软件分析DNA柱状图，精确分析细胞周期各个时期。

## **2.2** **G0/G1**期细胞在**Nocodazole**处理不同时间点所占比例

（1）稳定表达MDM2、MDM4S和对照组HepG2约1×106细胞分别接种于六孔板中，为减少误差，每组细胞做3个平行孔，培养至50%～70%融合时，加入Nocodazole 0.1μg/ml处理。在作用的0 h，8 h，12 h，18 h分别收集细胞，离心，弃上清。

（2）收集细胞后用500μl PBS洗一次，加入150μl预冷PBS悬浮细胞，之后缓慢加入350μl无水乙醇，终浓度为70%，重悬固定。轻轻混匀置4℃至少30 min。

（3）离心除去乙醇，用500μl PBS洗一次，加入500μl含有100μg/ml RNase

A的PBS，室温孵育30 min，离心，弃上清，细胞重悬于50μg /ml PI中，4℃染色30 min，用300目的尼龙膜过滤细胞，流式细胞仪检测细胞DNA含量。

## **2.3** **MTT**检测细胞增殖活性

采用MTT比色法检测稳定转染MDM2和MDM4S对细胞增殖的影响。MTT中文名为四甲基偶氮唑盐，MTT法被广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的检测，其原理如下：MTT可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成结晶状的深紫色甲瓒

（formazan）并沉积在细胞中，而死细胞无此功能。二甲基亚砜(DMSO)能溶解细胞中的甲瓒，用酶标仪在570nm波长处测定其吸光度值，可间接反映活细胞数量。细胞增殖越快，则吸光度越高；细胞毒性越大，则吸光度越低。具体操作如下：

（1）取对数生长期稳定转染MDM2、MDM4S及空白质粒组的HepG2细胞，以每孔2×103细胞接种于96孔板中，每组做三个平行孔，边缘孔用无菌PBS填充。37℃，5%CO2培养箱中孵育过夜。

（2）0.1μg/ml Nocodazole处理18 h，离心，弃去含有Nocodazole的细胞培养液，PBS洗一次，加入新的培养液继续培养20 h。

（3）每孔200μl细胞培养液，加入MTT液（5mg/ml）20μl， 置于37℃、

5%CO2培养箱继续培养4h。

（4）弃培养液，每孔加入DMSO 150μl，室温下振荡10min。

（5）使用酶标仪(570 nm)测定A值，取各组细胞A值分别计算细胞增殖活性，细胞增殖活性(%) =（实验孔A值/空白质粒对照孔A值）×100%。实验重复3次。

## **2.4** **Real-time RT-PCR**检测***TP53***和纺锤体检查点相关基因**mRNA**表达

收集约5×106稳定表达MDM2、MDM4S和空白对照组细胞，PBS洗一次，弃上清，Real-time RT-PCR检测*TP53* mRNA表达。稳定表达MDM2、MDM4S和空白对照组细胞分别用1μg/ml Nocodazole 及0.025% DMSO处理18 h后，收

集各孔细胞，离心，PBS洗一次，弃上清，Real-time RT-PCR检测*BubR1*、*Securin*

基因mRNA表达。β*-actin*基因作为内参。

（1）从GeneBank中查找*TP53*、*BubR1*、*Securin*的mRNA序列，在CDS

区用Primer Premier 5软件设计引物，引物序列如下：TP53F: 5'-GGACACTTTGCGTTCGGGC-3' TP53R: 5'-CTGACTGCGGCTCCTCCATG-3' BubR1F:5'-TTTCAGGAAGGGATTCAACAG-3'

BubR1R: 5'-CTTCTTCTTTCTCAAGTGCCAAC-3' Securin F: 5'-GATGACTGAGAAGACTGTTAAAGC- 3' Securin R: 5'-CCACTCAAGGGGAGGTGC-3'

β-actin F: 5'-AGGCCAACCGCGAGAA-3'β-actin R: 5'-CCGTCACCGGAGTCCAT-3'

（2）提取各组细胞总RNA及逆转录反应，具体操作同第一部分。

（3）Real-time RT-PCR体系配制及反应条件：

SYBR Premix Ex Taq(Tli RNaseH Plus)(2×) 12.5 μl PCR forward primer(10μM) 0.5 μl

PCR reverse primer(10μM) 0.5μl

cDNA模板2.0μl

去离子H2O 9.5μl

Total 25μl

取0.2ml薄壁PCR管，分别编号。向各管中加入2×qPCR TaqMix 12.5μl，10μM各基因正反向引物混合物0.5μl，cDNA各1μl，一管中不加模板作为阴性对照，各管加水至25μl，为了避免加样误差，体系尽量一次配制，分装各管，每个基因做三次取平均值以减少误差。PCR反应条件：预变性95℃10s，变性95℃15s，退火58℃～62℃30s，共40个循环，

（4）基因相对表达量的计算：基因相对表达量=目的基因表达量-内参β-actin表达量：△Ct实验组=Ct实验组－Ctβ-actin，△Ct对照组=Ct对照组－Ctβ-actin

## **2.5 Western-blot**：检测**P53**、**P21**、**BubR1**和**Securin**蛋白表达量变化

### **2.5.1** 蛋白样品的提取和制备

（1）细胞总蛋白的提取：稳定表达MDM2、MDM4S和空白对照组细胞培养，收集5～10×106各孔培养细胞（BubR1和Securin蛋白测定需要用1μg/ml

Nocodazole及0.025% DMSO处理18h后收集细胞），1000 rpm离心10 min，弃去上清液，用2 ml预冷PBS洗涤两次，离心，弃去上清液，加入50～100μl预冷至0℃的细胞裂解液重悬细胞，转移悬液至另一预冷的Eppendorf管中，冰上放置20 min后，12000 rpm，4℃离心裂解物15 min，转移上清液至另一预冷的Eppendorf管中，取少量上清液BAC法检测蛋白浓度。

（2）上样蛋白样本制备：根据蛋白定量结果，将所有蛋白样品调至相等浓度，按每份30μg分装蛋白上清液，与半量3×SDS上样缓冲液混匀，100℃煮沸3-5min，使蛋白变性，-70℃保存备用。每次上样前再次100℃煮沸3～5min。

### **2.5.2** **SDS-PAGE**凝胶的制备

（1）配制分离胶和积层胶：根据目的蛋白大小，选择配制合适浓度分离胶与5%积层胶，具体配方如表4-1。

表 4-1 分离胶与积层胶的配制

|  | 8%分离胶 | 10%分离胶 | 12%分离胶 | 5%积层胶 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1.5Mol/L Tris-Cl (PH=8.8) | 1.9 ml | 1.9 ml | 1.9 ml | --- |
| 1.0Mol/L Tris-Cl (PH=6.8) | --- | --- | --- | 1.4 ml |
| 30% Acr | 2 ml | 2.5 ml | 3 ml | 330μl |
| 10%SDS | 75μl | 75μl | 75μl | 20μl |
| 25%AP | 35μl | 35μl | 35μl | 8μl |
| TEMED | 4.5μl | 3μl | 3μl | 2μl |
| ddH2O | 3.45 ml | 2.95 ml | 2.45 ml | 1.4 ml |
| **Total volume** | 7 ml | 7 ml | 7 ml | 2 ml |

（2）制胶：将玻璃板洗净，用去离子水冲洗，晾干。将分离胶溶液用注射器缓慢注入两玻璃板之间的胶室，约加至梳子下1cm处停止灌胶，在胶面上小心覆盖一层0.1% SDS溶液封胶以隔离空气，并防止胶面在聚合过程中因表面张力而形成凹面。将凝胶放置室温下约30min待聚合完全后，倒出0.1% SDS溶液，用滤纸吸净残留液体。配制积层胶并灌注于分离胶上方，在玻璃板之间小心插入干净梳齿，避免产生气泡，室温放置约1h至完全凝固。

（3）上样：所有蛋白样品调整至等浓度后按顺序上样，每样品30μl，样品两侧的泳道用等体积的1×loding buffer上样，并加入5μl蛋白分子量Marker作为对照。

### **2.5.3** 电泳

将电泳装置与电源连接，接通电源，在积层胶电泳时，初始电压设置为80V恒压电泳，进入分离胶时改用100V电压恒压电泳，根据Marker蛋白分子量标准的电泳情况，当溴酚蓝指示剂前沿泳动至胶下缘约1cm处，并预计目的蛋白已经被适当分离后，停止电泳，关闭电源。

### **2.5.4** 转膜

从电泳装置上卸下玻璃板，用刀片小心拆开玻璃板，根据蛋白质分子量切下目的蛋白所在区域凝胶，剪下与凝胶大小相同的NC膜及略小1mm的滤纸，

将NC膜平铺于去离子水面，靠毛细作用自然吸水后浸入水中，以排除气泡，随后同滤纸一同浸泡入电转液中约5min充分浸湿。将膜做好标记后，在半干电转仪中从阳极到阴极按下列顺序依次放置：阳极→滤纸→NC膜→SDS-PAGE凝胶→滤纸→阴极，将各层边缘对齐，以防发生短路，用玻璃棒小心除去气泡。接通电源，按1.5mA/cm2，恒流转移30-50min。

### **2.5.5** 考马斯亮兰染色

为观察转膜是否完全，电转结束后，将凝胶放入考马斯亮兰染液中，在摇床上室温染色1~2 h，回收染液，移出凝胶至脱色液中，脱色3~4 h。观察胶上的条带是否转移完全。

### **2.5.6** 封闭

将NC 膜取出后，迅速置于5%封闭液中，置于室温摇床上缓慢摇动封闭

2h后取出。

### **2.5.7** 一抗孵育

弃去封闭液，将NC膜置于TBST稀释的一抗中（兔抗人Securin单克隆抗体（1:500）；兔抗人BubR1多克隆抗体（1:500）；鼠抗人P53单克隆抗体（1:400）；鼠抗人P21单克隆抗体（1:500）鼠抗人β-actin单克隆抗体（1:1500），置摇床上，4℃缓慢摇动孵育过夜。一抗孵育结束后，回收一抗液，用TBST洗膜三次，每次10min。

### **2.5.8** 二抗孵育

将NC膜置于TBST稀释的二抗中（羊抗鼠IgG，羊抗兔IgG抗体的稀释浓度均为1: 2000），室温下慢摇孵育2 h。结束后TBST洗膜三次，每次10min。

### **2.5.9** 化学发光检测

NC膜用去离子水漂洗一次，滤纸贴角吸干水分，将Super Signal West pico化学发光底物试剂盒中A液与B液按1: 1比例混合，逐滴加在NC膜正面，作用5-10min后，置于保鲜膜内固定于暗盒中，在暗室中将胶片置于NC膜上，关闭胶盒，根据所见荧光强度曝光。取出胶片立即完全浸入显影液中23秒，清

水漂洗一下后放在定影液中约5min 至底片完全定影，清水冲洗晾干，标定

Marker，进行分析与扫描。凝胶成像分析系统摄像分析，以目的蛋白条带的灰度值/内参蛋白条带的灰度值表示目的蛋白的相对表达量。

## **2.6** 统计学处理

细胞周期实验数据采用多个样本构成比比较；细胞增殖活性采用均数比较的t检验；用△Ct（Ct实验组－Ctβ-actin）法处理实时荧光定量RT-PCR所得的Ct值数据；采用Inage J软件对蛋白电泳条带灰度值进行扫描，Graphpad prism 4对扫描结果进行分析，计算各个蛋白的相对表达量，应用SPSS11.5统计软件处理数据，原始数据符合正态分布的采用*x*±s表示，两组均数比较采用t检验，方差不齐用t’检验；不服从正态分布的经对数转化后服从正态分布，*P*<0.05为差异具有统计学意义。

结果

**1. 细胞周期检测**

稳定表达MDM2、MDM4S和对照组HepG2细胞在Nocodazole 0.1μg/ml作用18小时后，PI染色，流式细胞检测细胞周期各期细胞百分比如图4-2所示。从图中可以看出，空白质粒组多数细胞停留在4N（51.94%），即M期，其余两组4N的百分比分别为：（MDM2:33.35%; MDM4S: 37.32%）。经统计学分析，与空白对照组相比，稳定表达MDM2和MDM4S的两组细胞4N细胞比值减少，

即M期所占比例减少，*P*＜0.01，具有统计学意义（表4-2）。



图4-2 细胞周期分析结果及统计图

图4-2 稳定表达MDM2, MDM4S 及空白对照的HepG2细胞在Nocodazole处理18小时后，

PI染色，流式细胞仪检测DNA含量，柱状图为各组细胞在Nocodazole处理18小时后，M期细胞所占比例，\*表示*P*＜0.01。

表4-2 各组细胞在Nocodazole处理18小时后处于4N细胞所占比例

| 处于 4N 期  分组 | | 非处于 4N 期  4N 百分比 2 | | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 细胞的个数 | 细胞的个数 |  |  |
| 空白质粒 | 16806 | 15554 | 51.93 |  |
| MDM4S | 12474 | 20962 | 37.32 | 1158.57\* |
| MDM2 | 11094 | 22168 | 33.35 | 712.31\* |

注\*表示P＜0.01

**2. Nocodazole处理不同时间点G0/G1期细胞所占的比例**

各组细胞在Nocodazole处理不同时间点G0/G1期细胞所占的比例见图4-3。从图中可以看出，在0h, G0/G1期细胞所占的比例在40%～60%，到8h，三组细胞G0/G1期细胞所占的比例明显下降，随着作用时间的延长，三组细胞G0/G1期细胞所占的比例逐渐上升，但是稳定表达MDM2、MDM4S的两组细胞上升

更明显。在Nocodazole处理18h时与空白对照组相比差异具有统计学意义（*P*＜

0.05）. 说明中期的阻滞在MDM4S组是降低的。



图 4-3 Nocodazole作用不同时间点各组G0/G1期细胞所占比例，\*表示*P*＜0.05

**3. MTT法检测细胞增殖**

（1）稳定表达MDM4S和MDM2及空白对照组用Nocodazole处理18h后，离心除去Nocodazole, PBS洗一次，加入含10%胎牛血清的DMEM高糖培养液再继续培养20h，加入MTT培养4h, DMSO振荡10min，使用酶标仪(570 nm)测定A值，取各组细胞A值分别计算细胞增殖活性。细胞增殖活性(%) =（实验孔A值/空白质粒对照孔A值）×100%。实验重复3次。结果如图4-4所示。

MDM2、MDM4S组细胞A值分别是1.54±0.24、1.56±0.12。经过统计分析：稳定表达MDM4S细胞和MDM2与空白对照组比较，细胞增殖活性增高，并且具有统计学意义（*P*＜0.05）。



**4. Real-time RT-PCR**

图4-4 各组细胞增殖活性，\*表示*P*＜0.05

检测Nocodazole及DMSO处理后，稳定表达空载体、MDM2及MDM4S

细胞TP53和纺锤体检查点相关基因mRNA的表达水平，β-actin基因作为内参。

## **4.1** 扩增曲线及溶解曲线图

p53、BubR1、Securin三个基因的溶解曲线均为单峰（图4-5），表明引物与模板特异结合，扩增产物具有特异性。



图 4-5 P53, BubR1, Securin及β-actin扩增曲线及溶解曲线图

## **4.2** 各组细胞***TP*53 mRNA**表达水平

*TP*53相对表达量△Ct=Ct实验组－Ctβ-actin（见表4-3）。

表 4-3 TP53 mRNA表达水平

Vector( *x*±s) MDM2( *x*±s) MDM4S( *x*±s)

TP53 1.1770±0.2102 1.4760±0.2542# 1.4210±0.0845#

注：#表示*P*＞0.05

采用两均数比较的t检验对各个实验组和对照组均数进行比较，结果显示，稳定表达MDM2、MDM4S组*TP*53 mRNA相对表达量与空白质粒组相比，差异

无统计学意义。

## **4.3** ***BubR1***和***Securin***基因**mRNA**表达

按照公式：目的基因相对表达量=目的基因表达量-内参*β-actin*表达量，即

△Ct实验组=Ct实验组－Ctβ-actin，△Ct对照组=Ct对照组－Ctβ-actin（见表4-4）。

表 4-4 *BubR1*和*Securin*基因mRNA表达水平

0.025% DMSO( x±s) Nocodazole( x±s)

| GENES | Vector | MDM2 | MDM4S | Vector | MDM2 | MDM4S |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| BubR1 | 2.54±0.85 | 1.06±0.91\* | 1.21±0.48\* | 2.83±0.66 | 0.50±0.12\* | 1.05±0.17\* |
| Securin | 1.38±0.46 | 1.27±0.47 | 0.62±0.78\* | 3.46±0.27# | 1.13±0.37 | 0.41±0.24\* |

注：#表示与0.025%DMSO组相比，*P*＜0.05，\*表示与Control相比，*P*＜0.05

统计方法及结果分析：采用两样本均数比较的t检验，结果显示，稳定表达

MDM2、MDM4S组*BubR1* mRNA表达水平下降，与对照组相比，具有统计学意义（*P*＜0.05）。在MDM4S组，*Securin* mRNA表达水平下降，与对照组相比，具有统计学意义（*P*＜0.05）。Nocodazole处理空白质粒组，*Securin* mRNA表达升高，与DMSO处理组相比具有统计学意义（*P*＜0.05）。

# **5.** **Western-blot**检测**P53**、**P21**及纺锤体检查点相关蛋白表达

## **5.1** **P53**、**P21**表达水平检测

约5×106个稳定表达空质粒、MDM2、MDM4S的三组细胞，分别提取总蛋白，western-blot检测P53、P21表达水平。从图中可以看出，在稳定表达MDM2组，P53、P21表达水平均下降；在稳定表达MDM4S组，p21表达水平下降（图4-6A）。



图 4-6 P53, P21蛋白在各组细胞的表达水平及统计图

图4-6 A表示P53, P21在各组细胞的表达水平，cont.表示空白质粒对照组，MDM2为稳定表达MDM2组，MDM4S为稳定表达MDM4S组。图4-6B为各组P53、P21表达水

平统计图。\*表示*P*＜0.05，\*\*表示*P*＜0.01

采用Inage J软件对蛋白电泳条带灰度值进行扫描，Graphpad prism 4对扫描结果进行分析，以目的蛋白条带的灰度值/内参蛋白条带的灰度值表示目的蛋白的相对表达量，结果见图4-6 B。采用SPSS11.5统计软件进行统计分析，在稳

定表达MDM2组，P53、P21表达水平均下降，差异具有统计学意义(*P*＜0.05)；

在稳定表达MDM4S组，P21表达水平下降，差异具有统计学意义(*P*＜0.01)（表4-5）。

表 4-5 P53、P21蛋白在各组相对表达量比较

| 组别 | P53 表达量( x ±s) | P21 表达量( x ±s) |
| --- | --- | --- |
| Vector | 0.9046±0.109 | 0.836±0.128 |
| MDM2 | 0.448±0.114\* | 0.475±0.146\* |
| MDM4S | 0.845±0.040 | 0.403±0.100\*\* |

注：\*表示*P*＜0.05，\*\*表示*P*＜0.01

## **5.2** **BubR1**、**Securin**蛋白表达水平检测

1μg/ml Nocodazole或0.025% DMSO处理18 h，分别检测各组细胞后期促进复合物（anaphase-promoting complex, APC）抑制剂BubR1和APC作用底物

Securin蛋白的表达水平。由图4-7可以看出无论在0.025% DMSO处理组还是

Nocodazole处理组，与Control相比在稳定表达MDM2和MDM4S细胞中BubR1、

Securin蛋白表达水平下降。空白质粒组在Nocodazole处理后，Securin蛋白表达水平升高。

采用Image J软件对蛋白电泳条带灰度值进行分析，以目的蛋白条带的灰度值/内参蛋白条带的灰度值表示目的蛋白的相对表达量，采用Graphpad prism 4软件对结果进行分析，采用SPSS11.5对数据进行两样本均数比较的t检验。结果显示在0.025% DMSO组，稳定表达MDM2、MDM4S组BubR1

表达水平下降，与对照组相比，具有统计学意义（*P*＜0.01）。在MDM4S组，

Securin表达水平下降，与对照组相比，具有统计学意义（*P*＜0.05）。

Nocodazole处理组，稳定表达MDM2、MDM4S组BubR1表达水平下降，与对照组相比，差异具有统计学意义（*P*＜0.01）；Securin表达水平下降，差异具有统计学意义（*P*＜0.05或*P*＜0.01）；Nocodazole处理空白质粒组，Securin表达升高。



图4-7 各组细胞BubR1和Securin表达水平及统计图

图4-7A为各组细胞BubR1和Securin 蛋白Western-blot结果，“-"表示0.025% DMSO处理，”+"表示加入1μg/ml Nocodazole处理18h；B为0.025% DMSO处理组BubR1, Securin蛋白表达柱状图；C为1μg/ml Nocodazole 处理组BubR1, Securin蛋白表达柱状图。

\*表示*P*＜0.05，\*\*表示*P*＜0.01.

讨论

伴复杂核型AML在急性髓系白血病中发生率达到10%～15%，化疗缓解率低，预后较差。复杂核型的发生机制中，*TP53*基因突变是最主要的原因。在表达野生型P53的肿瘤中，其机制与P53通路受抑制有关。P53抑制因子MDM2和MDM4的作用近年来越来越受到重视，MDM4的短剪接体MDM4-S只保留了P53结合结构域，研究发现[22]，在骨肉瘤中，MDM4-S较全长MDM4-FL 与

P53结合更稳定，对P53抑制作用更强。因此我们构建了MDM2、MDM4S慢病毒表达载体，感染表达野生型P53的HepG2细胞，在稳定表达MDM2、MDM4S的细胞检测细胞周期、细胞增殖及纺锤体相关基因表达的改变，初步阐明存在野生型P53的AML中复杂核型形成的机制。

**1. p53通路与复杂核型**

*TP53*基因是最重要的抑癌基因之一，50%以上人类肿瘤中发生*TP*53基因的突变或缺失，表达野生型P53的肿瘤患者中，其发生机制可能是由于P53的活性受到其他蛋白的调控，造成功能低下[40,41]。在细胞周期中，P53的调节功能主要体现在对G1/S检查点和纺锤体检查点的监测，纺锤体检查点的完整性保证细胞分裂时染色体均等分配。研究表明，当应用纺锤体抑制剂Nocodazole处理p53-/-小鼠成纤维细胞时，细胞可进行核内复制，导致多倍体形成，表明p53在小鼠纺锤体检查点调控中起作用[42-44]。细胞周期在各种因素导致DNA损伤时，

p53通过转录激活作用使得p21高表达，细胞周期停滞，DNA修复或细胞凋亡

（图4-11）。当P53功能低下时，下游激活作用受抑制，P21表达水平下降，纺锤体检查点功能减弱，分裂中期纺锤丝与染色体着丝点未全部正常连接时，细胞即进入后期，导致染色体数目的异常，即复杂核型的发生[45]。

在本实验中，*TP53* mRNA表达水平在对照组和稳定转染MDM4S组相比无差异，在蛋白水平，可见在稳定表达MDM2组，P53蛋白表达水平下降，而稳定表达MDM4S组，P53蛋白表达水平与对照组相比无统计学意义，P21表达水平下降，与对照组相比具有统计学意义。说明MDM4S组P53功能的下降是由

于MDM4S与P53蛋白结合，抑制了P53的转录活性，导致下游P21蛋白表达水平下降所致。Castedo[46]等的研究发现，在DNA损伤发生时，P53通路的抑制使得细胞凋亡率下降，细胞继续增殖，最终发生非整倍性的后果。在我们的研究中，表达野生型P53的细胞株MDM4S表达升高，即MDM4S/MSDM4FL比值升高，导致P53通路的抑制，有可能是造成复杂核型形成的机制之一。



图 4-11 P53通路

**2. 纺锤体检查点异常与复杂核型**

在有丝分裂期间，染色体的精确分离对于保持遗传的稳定性是非常重要的。纺锤体检查点（spindle checkpoint）是细胞周期中的一个重要检查点，它阻滞细胞进入分裂后期直到所有染色体着丝点正确与微管连结，确保染色体均等分配，维持基因组稳定性。如果出现纺锤体检查点异常，细胞在受到DNA损伤后不能正常启动检查点，有丝分裂仍然进行必然会形成非整倍体或多倍体细胞，增加了遗传不稳定性。

BubR1 是纺锤体检查点重要的相关蛋白，与后期促进复合 体

（anaphase-promoting complex, APC）结合，抑制APC活性，在监测细胞有丝分裂中期向后期转化的过程中起着重要的作用，调节细胞周期的进程。在有丝分裂中期，若姐妹染色单体没有完全与纺锤体微管连结，纺锤体检查点相关蛋白与APC结合，抑制APC介导的Securin和Cyclin B的泛素化降解，延迟进入

后期，即发生M期阻滞。而Securin是APC的主要作用底物之一，当APC活化后，通过泛素化降解Securin，分离酶（Sseparase）被活化，姐妹染色单体分开，细胞周期进入后期[47](图4-12)。



图 4-12 纺锤体检查点的调控[47]

在本实验中，用微管工具药Nocodazole处理细胞18h后，检测BubR1、Securin的mRNA表达水平，结果显示，稳定表达MDM2和MDM4S组细胞BubR1 mRNA表达水平均有不同程度下降，与空白对照组比较差异具有统计学意义。此外，对照组在Nocodazole处理后，Securin表达水平升高，与文献报道[48]一致，APC在这类细胞中是失活的，功能正常。与此相反，稳定表达MDM2和MDM4S细胞中，用Nocodazole处理后，Securin表达水平下降，提示在这类细胞中，APCcdc20是有活性的，导致Nocodazole处理细胞中期阻滞降低。

Western-blot检测BubR1、Securin表达水平，也显示稳定表达MDM2 和

MDM4S 组表达水平下降。从实验结果可以解释实验组细胞在微管工具药

Nocodazole处理18h后，细胞周期中M期细胞百分比下降和G0/G1细胞百分比升高，MTT法检测MDM2、MDM4S细胞增殖活性升高，这些实验结果都直接或间接支持在稳定感染MDM2、MDM4S的细胞中纺锤体检查点功能减弱。

通过以上对MDM4S高表达HepG2细胞株中P53及纺锤体检查点相关蛋白的表达研究，可以看出，在表达野生型P53的细胞中导入外源性MDM4S使得

P53及其下游效应分子P21表达下降，纺锤体检查点的相关蛋白BubR1、Securin

表达也下降。如前所述，在急性髓系白血病中，复杂核型发生的机制与*TP53* 突

变密切相关[19, 27]，而表达野生型P53 的AML 患者，复杂核型的发生可能与

MDM4S高表达抑制P53通路活性，进而减弱纺锤体检查点的功能，导致细胞发生非整倍性有关。

结论

1. 复杂核型组*MDM*4-*S*相对表达量高于正常核型组。

2. 稳定转染MDM2、MDM4-S细胞株纺锤体检查点功能减弱。

3. 过表达MDM4S即提高细胞内*MDM*4S/*MDM*4FL比值，可抑制P53通路活性。

4. 表达野生型P53的急性髓系白血病患者复杂核型的形成与MDM4-S高表达抑制P53通路活性，进而导致纺锤体检查点功能减弱有关。

参 考 文 献

[1] Geng Z, Zhang H, Wang D, Xiao Y, Wang N, Li C, Huang L, Zhou J. Combination of cytogenetic analysis and molecular screening in patients with de novo acute myeloid leukemia. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2012, 32(4): 501-510.

[2] Armand P, Kim HT, DeAngelo DJ, Ho VT, Cutler CS, Stone RM, Ritz J, Alyea EP, Antin JH, Soiffer RJ. Impact of cytogenetics on outcome of de novo and therapy-related AML and MDS after allogeneic transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2007, 13(6): 655-664.

[3] Yang XF, Sun AN, Yin J, Cai CS, Tian XP, Qian J, Chen SN, Wu DP. Monosomal karyotypes among 1147 Chinese patients with acute myeloid leukemia: prevalence, features and prognostic impact. Asian Pac J Cancer Prev. 2012, 13(11): 5421-5426.

[4] Perrot A, Luquet I, Pigneux A, Mugneret F, Delaunay J, Harousseau JL, Barin C,

Cahn JY, Guardiola P, Himberlin C, Recher C, Vey N, Lioure B, Ojeda-Uribe M, Fegueux N, Berthou C, Randriamalala E, BénéMC, Ifrah N, Witz F; Groupe Ouest-Est des Leucémies Aiguës et Maladies du Sang. Dismal prognostic value of monosomal karyotype in elderly patients with acute myeloid leukemia: a

GOELAMS study of 186 patients with unfavorable cytogenetic abnormalities. Blood. 2011,118(3):679-685.

[5] David Grimwade, Helen Walker, Fiona Oliver, Keith Wheatley, Christine Harrison, Georgina Harrison, John Rees, Ian Hann, Richard Stevens, Alan Burnett and Anthony Goldstone. The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML: Analysis of 1,612 Patients Entered Into the MRC AML 10 Trial. Blood.1998,92: 2322-2333

[6] John C. Byrd, Krzysztof Mro´zek, Richard K. Dodge, Andrew J. Carroll, Colin

G. Edwards, Diane C. Arthur, Mark J. Pettenati, Shivanand R. Patil, Kathleen W. Rao, Michael S. Watson, Prasad R. K. Koduru, Joseph O. Moore, Richard M. Stone, Robert J. Mayer, Eric J. Feldman, Frederick R. Davey, Charles A. Schiffer, Richard A. Larson, and Clara D. Bloomfield. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction succes cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Blood. 2002,100 (13):4325-4336.

[7] McConnell TS, Cram LS, Baczek N, Fawcett JJ, Luedemann M, Bartholdi MF. The clinical usefulness of chromosome analysis by flow cytometry. Semin Diagn Pathol. 1989,6(1):91-107.

[8] Van Gele M, Leonard JH, Van Roy N, Van Limbergen H, Van Belle S, Cocquyt V, Salwen H, De Paepe A, Speleman F. Combined karyotyping, CGH and M-FISH analysis allows detailed characterization of unidentified chromosomal rearrangements in Merkel cell carcinoma. Int J Cancer. 2002,101(2):137-145.

[9] Mrozek K. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. Seminars in Oncology, 2008,35:365-377 .

[10] Carpenter NJ. Molecular cytogenetics. Semin Pediatr Neurol. 2001,8(3):135- 146.

[11] Kearney L, Horsley SW. Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects. Chromosoma. 2005,114(4):286-294.

[12] Stone RM.. Prognostic factors in AML in relation to (ab) normal karyotype. Best Practice and Research Clinical Haematology. 2009,22 (4):523-528.

[13] Ferrara F. Palmieri S. Leoni F. Clinically useful prognostic factors in acute myeloid leukemia, Crit Rev Oncol Hematol. 2008,66(3):181-193.

[14] Perrot A, Luquet I, Pigneux A, Mugneret F, Delaunay J, Harousseau JL, Barin C, Cahn JY, Guardiola P, Himberlin C, Recher C, Vey N, Lioure B, Ojeda- Uribe M, Fegueux N, Berthou C, Randriamalala E, BénéMC, Ifrah N, Witz; Dismal prognostic value of monosomal karyotype in elderly patients with acute myeloid leukemia: A GOELAMS study of 186 patients with unfavorable cytogenetic abnormalities. Blood.2011,118(3): 679-685.

[15] Yan L, Ping N, Zhu M, Sun A, Xue Y, Ruan C, Drexler HG, Macleod RA, Wu D, Chen S. Clinical, immunophenotypic, cytogenetic, and molecular genetic features in 117 adult patients with mixed-phenotype acute leukemia defined by WHO- 2008 classification. Haematologica. 2012, 97(11):1708-1712.

[16] Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, Van Zelderen-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KB, Mellink CH, Nieuwint A, Jotterand M, Hagemeijer A, Beverloo HB, Löwenberg B. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia:

A better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. J Clin Oncol. 2008,26(29):4791-4797.

[17] Medeiros BC. Unveiling the complexity of CK+AML. Blood.2012,119(9): 1958-1959.

[18] Peller S, Rotter V. TP53 in hematological cancer: low incidence of mutations with significant clinical relevance. Hum Mutat. 2003, 21(3):277-84.

[19] Rücker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, Habdank M, Kugler CM, Holzmann K, Gaidzik VI, Paschka P, Held G, von Lilienfeld- Toal M, Lübbert M, Fröhling S, Zenz T, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Lichter P, Döhner K, Döhner H. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. Blood.2012,119(9): 2114-2121

[20] Shangary S, Wang S. Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy. Clin Cancer Res. 2008,14(17):5318-5324.

[21] Wang H, Ma X, Ren S, Buolamwini JK, Yan C. A small-molecule inhibitor of MDMX activates p53 and induces apoptosis. Mol Cancer Ther.2011,10(1): 69-79.

[22] Lenos K, Grawenda AM, Lodder K, Kuijjer ML, Teunisse AF, Repapi E, Grochola LF, Bartel F, Hogendoorn PC, Wuerl P, Taubert H, Cleton-Jansen AM, Bond GL, Jochemsen AG. Alternate splicing of the p53 inhibitor HDMX offers a superior prognostic biomarker than p53 mutation in humancancer. Cancer Res.2012,72(16):4074-4084.

[23] Melo AN, Eischen CM. Protecting the Genome from Mdm2 and Mdmx. Genes Cancer 2012,3(3-4):283-290

[24] Popowicz GM, Czarna A, Rothweiler U, Szwagierczak A, Krajewski M, Weber L, Holak TA. Molecular Basis for the Inhibition of p53 by Mdmx. Cell Cycle. 2007, 6(19):2386-2392.

[25] Harutyunyan A, Klampfl T, Cazzola M, Kralovics R. p53 lesions in leukemic transformation. N Engl J Med.2011,364(5):488-490

[26] Haferlach C, Alpermann T, Schnittger S, Kern W, Chromik J, Schmid C, Pielken HJ, Kreuzer KA, Höffkes HG, Haferlach T. Prognostic value of monosomal karyotype in comparison to complex aberrant karyotype in acute myeloidleukemia: a study on 824 cases with aberrant karyotype Blood. 2012, 119(9):2122-2125.

[27] Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype (Germany) Leukemia. 2008,22(8):1539- 1541

[28] Greif PA, Konstandin NP, Metzeler KH, Herold T, Pasalic Z, Ksienzyk B, Dufour A, Schneider F, Schneider S, Kakadia PM, Braess J, Sauerland MC, Berdel WE, Büchner T, Woermann BJ, Hiddemann W, Spiekermann K, Bohlander SK. RUNX1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia are associated with a poor prognosis and up-regulation of lymphoid genes. Haematologica. 2012, 97(12):1909-1915.

[29] Shvarts, A, Bazuine, M, Dekker, P, Ramos, Y. F, Steegenga, W. T, Merckx, G, van Ham, R. C, van der Houven van Oordt, W, van der Eb, A. J. and Jochemsen, A. G. Isolation and identification of the human homolog of a new p53-binding protein Mdmx. Genomics. 1997,43(1):34-42.

[30] Marine JC, Dyer MA, Jochemsen AG. MDMX: from bench to bedside. J Cell Sci. 2007, 120 (Pt3):371-378.

[31] Pei D, Zhang Y, Zheng J. Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and MdmX. Oncotarget, 2012,3(3):228-235

[32] He M, Zhao M, Shen B, Prise KM, Shao C. Radiation-induced intercellular signaling mediated by cytochrome-c via a p53-dependent pathway in hepatoma cells. Oncogene. 2011,30(16):1947-1955.

[33] Lundgren K, Montes de Oca Luna R, McNeill YB, Emerick EP, Spencer B, Barfield CR, Lozano G, Rosenberg MP, Finlay CA. Targeted expression of MDM2 uncouples S phase from mitosis and inhibits mammary gland develop- ment independent of p53. Genes Dev. 1997,11(6):714-725.

[34] Marine JC, Francoz S, Maetens M, Wahl G, Toledo F, Lozano G. Keeping p53 in check: Essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. Cell Death

Differ. 2006,13(6): 927‑934.

[35] Francoz S, Froment P, Bogaerts S, De Clercq S, Maetens M, Doumont G, Bellefroid E, Marine JC. Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in

Proliferating and quiescent cells in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 2006, 103 (9):3232‑3237.

[36] Toledo F, Krummel KA, Lee CJ, Liu CW, Rodewald LW, Tang M, Wahl GM. A mouse p53 mutant lacking the proline‑rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2‑Mdm4‑p53 regulatory network. Cancer Cell. 2006, 9(4): 273‑285.

[37] Gilkes DM, Chen J. Distinct roles of MDMX in the regulation of p53 response to ribosomal stress. Cell Cycle.2007, 6(2):151‑155.

[38] Liu L, Fan L, Fang C, Zou ZJ, Yang S, Zhang LN, Li JY, Xu W. S-MDM4 mRNA overexpression indicates a poor prognosis and marks a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. Cancer Sci. 2012,103(12):2056-2063.

[39] Bo MD, Secchiero P, Degan M, Marconi D, Bomben R, Pozzato G, Gaidano G, Del Poeta G, Forconi F, Zauli G, Gattei V. MDM4 (MDMX) is overexpressed in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) and marks a subset of p53wild-type CLL with a poor cytotoxic response to Nutlin-3. Br J Haematol. 2010,150(2):237-239.

[40] Jin L, Hu WL, Jiang CC, Wang JX, Han CC, Chu P, Zhang LJ, Thorne RF, Wilmott J, Scolyer RA, Hersey P, Zhang XD, Wu M. MicroRNA-149\*, a p53- responsive microRNA, functions as an oncogenic regulator in human melanoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011,108(38):15840-15845.

[41] Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang SJ, Strong LC, Lozano G, Levine AJ. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. Cell. 2004,119(5):591-602.

[42] Cross SM, Sanchez CA, Morgan CA, Schimke MK, Ramel S, Idzerda RL, Raskind WH, Reid BJ. A p53-dependent mouse spindle checkpoint. Science.

1995,267(5202): 1353- 1356.

[43] Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. Oncogene. 2001, 20(15):1803-1815.

[44] Zhi L, Zhang J, Jia Y, Shan S, Li Y, Wang D, Wang M, Rao Q, Xing H, Tang K, Tian Z, Wang J, Mi Y. Effect of G-rich oligonucleotides on the proliferation of leukemia cells and its relationship with p53 expression. Oligonucleotides. 2011,21(1):21-27.

[45] Gogolin S, Batra R, Harder N, Ehemann V, Paffhausen T, Diessl N, Sagulenko V, Benner A, Gade S, Nolte I, Rohr K, König R, Westermann F. MYCN- mediated over- expression of mitotic spindle regulatory genes and loss of p53-p21 function jointly support the survival of tetraploid neuroblastoma cells. Cancer Lett.2013,30,331(1): 35-45.

[46] Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Valent A, Raslova H, Yakushijin K, Horne D, Feunteun J, Lenoir G, Medema R, Vainchenker W, Kroemer G. Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. Oncogene. 2004, 23(25):4362-4370.

[47] Kim S, Yu H. Mutual regulation between the spindle checkpoint and APC/C Semin Cell Dev Biol. 2011,22(6): 551-558.

[48] Uhlmann F, Wernic D, Poupart MA, Koonin EV, Nasmyth K. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. Cell. 2000,103(3): 375-386.

·综述・

伴复杂核型急性髓系白血病研究进展

摘 要

急性髓系白血病（acute myeloid leukemia, AML）伴有3种或3种以上获得性染色体畸变，但是不包括t(8;21)(q22; q22), inv(16)(p13q22) /t(6;16)(p13; q22)和

t(15;17)(q22; q21)这几种预后良好的核型，称为复杂核型AML(complex karyotype AML, CK-AML)。CK-AML发生率大约占成人AML的10%～15%，而且随着年龄的增长发病率逐渐升高。复杂核型中染色体异常的类型包括-7，-5, del(7q)，del(5q)，del(9q)，abn(3q)，11q23，+8，+21, +22和来源不明的marker染色体以及其他染色体数目或结构畸变等，采用光谱核型分析（multicolor spectral karyotyping, SKY）和多色荧光原位杂交（multiplex fluorescence in situ hybridization, M-FISH）可以较准确判断复杂核型中染色体的畸变类型。CK-AML的化疗缓解率低，预后较差。复杂核型形成的机制中，多数集中于*TP*53基因突变方面，大约有70%左右的CK-AML患者*TP*53基因突变，而正常核型中*TP*53突变率只有2.1%。说明*TP*53基因突变在复杂核型形成中起着重要的作用。在大约30%表达野生型P53的CK-AML中，复杂核型的发生机制是否由于P53抑制因子*MDM*2或*MDM*4的高表达导致？在这方面还没有深入研究。一些针对

MDM2或MDM4的小分子化合物也已经应用于临床，部分取得了较好的疗效。今后需要对AML患者中复杂核型发生的分子生物学进行深入研究，针对特定的基因水平改变，寻找新的治疗靶点，从而改善这类患者预后。

关键词

急性髓系白血病；复杂核型；*TP*53；*MDM2*；*MDM4*；*MDM4-S*；纺锤体检查点

1. 复杂核型的定义及发Th率

复杂核型（Complex karyotype, CK）最初由英国急性髓系白血病医学研究理事会工作组（the Medical Research Council AML Working Group）提出至少包含

5种以上的染色体畸变的核型异常称为复杂核型[1]。2002年，美国癌症与白血病小组（A Cancer and Leukemia Group B, CALGB）通过对1213例初发髓系白血病患者研究发现，伴有3种、4种或5种以上染色体核型异常的急性髓系白血

病预后相似，因此将复杂核型定义为伴有3种或3种以上互不相关的染色体畸变，并且不包括t(8;21)(q22; q22)、t(15;17)(q22; q11-12)和t(16;16)(p13; q22) /inv(16)

（p13q22）等特异性染色体易位者[2]。2008 年，世界卫生组织（the World Health

Organization，WHO）将原来的“AML伴3种或3种以上获得性染色体异常且没有染色体重排”，即“AML伴再现性遗传学异常者”定义为伴复杂核型的AML

(AML with complex karyotype, CK-AML)。

复杂核型在成人急性髓系白血病中大约占10%～15%，而且随着年龄的增长发生率逐渐增加[3]。英国医学研究理事会的研究结果发现小于55岁的AML中，大于5种或5种以上的染色体畸变占6%，大于55岁以上AML患者中发生率为

13%[4]。同样在Schoch C[5]的研究中，小于60岁染色体发生3种或3种以上染

色体畸变占8%，大于60岁占18%。最近对两个分别为60岁及以上者[6]和60

岁以上者[7]大样本的研究显示复杂核型发生率分别为19%和17%。然而对另一个

60岁及以上AML样本的研究发现，复杂核型的发生率较低，为12%[8]. Schoch[9]等在基于人群的研究中，估计21-30岁伴有3种或3种以上复杂核型的AML发生率为0.05/10万，在60-70岁，发生率增高了25倍。复杂核型在继发性的AML和治疗相关的AML患者中较初发AML发生率高两倍[4, 9]。

2. CK-AML染色体畸变的特征及检测方法

复杂核型中染色体异常的类型包括-7，-5，del(7q)，del(5q)，del(9q)，abn(3q)，

11q23, +8，+21, +22和来源不明的marker染色体以及其他染色体数目或结构

畸变等。近年来，光谱核型分析（spectral karyotyping, SKY）和多色荧光原位杂交（multiplex fluorescence in situ hybridization, M-FISH）技术的应用使得对复杂核型中染色体畸变的识别更加准确。虽然复杂核型定义为含有3种或3种以上

染色体畸变，但是极少数个体染色体畸变数目可多达30种。在三个大样本的CK-AML核型分析中，应用了SKY和M-FISH检测，结果发现，90%患者染色体畸变数目至少达到5种，中位数分别是6种，8种和10种。染色体数目畸变

包括亚二倍体（≤45），超二倍体（≥47），假二倍体（染色体总数为46条，但是含有某号染色体的增加或减少）以及多倍体（3倍体或4倍体）等。整条染色体丢失中，-7发生率最高（20%～30%），其次是-8（20%）和-17（10%～15%）。而三体型中，+8发生率最高（25%），其他三体型约占5%～10%，常见有+9，

+10, +11，+13，+21, +22等。染色体结构畸变包括相互易位、倒位、缺失和插入等发生率也较高，不平衡的结构畸变造成均质染色区、双微体、Marker染色体、环状染色体等后果，其中21号、11号、22号、13号和15号染色体发生率最高[10, 11, 12]。

常规细胞遗传学技术（conventional cytogenetics, CC）G或R显带技术检测成人AML 的核型异常的检出率约为54%-78%，仍有45%左右的AML显示正常核型。这些具有正常核型的AML对治疗的反应和生存期依然具有很大的异质性。荧光原位杂交（fluorescence in situ hybridization, FISH）检测通常只能用

1～2种探针对CC分析有疑问的1～2条染色体进行检测，依赖于已知的染色体异常，如BCR/ABL、AML1-ETO、PML/RARα、*TP53*缺失、+8等已知的染色体断裂重排、或缺失或三体型等。CC是最基本的检查，FISH则是其重要的补充，二者结合可提供更全面的遗传学信息。多色荧光原位杂交（multiplex fluorescence in situ hybridization, M-FISH）技术有助于阐明复杂核型异常中标记染色体和衍生染色体的来源。光谱核型分析（spectral karyotyping, SKY）采用5种荧光随机组合，通过1次杂交就可同时使人类24条染色体显示不同的颜色，可鉴别染色体重排，特别是易位、插入及可以产生标记染色体的许多复杂的染

色体结构畸变，对各种标记染色体的来源可清楚判断。复杂核型中有时所包含的畸变染色体数目很多，包括Marker染色体、等臂染色体、环状染色体、均质染色区、双微体和不平衡易位等无法用普通的G或R显带鉴别，分子细胞遗传学技术，如SKY和M-FISH技术的应用使染色体畸变的判断和定位更加准确[3]。比较基因组杂交（comparative genomic hybridization, CGH）和array-CGH可提供复杂核型更精确的细节。AML中10％～12％的复杂染色体核型单靠CC尚不能阐明其异常的性质，近年来，许多学者应用新的分子遗传学和分子生物学技术，揭示了CC未检出的隐匿异常，阐明了复杂核型异常的性质。

# 3. CK-AML的预后

伴复杂核型AML患者预后非常差，在这方面的研究也较多。Ferrara等[13]分析了AML中临床有价值的预后影响因素，发现年龄≤60岁，伴有t(8;21)(q22; q22), t(16;16)(p13; q22) 或者inv (16)(p13; q22), t(15;17)(q22; q12-21)

者预后良好；中等预后者约占AML患者的50%-60%，包括正常核型及其他异常者；而年龄≥60岁，伴有-5/5q-, -7/7q-及复杂核型者预后较差。Haferlach C[14]通过对824例伴复杂核型的AML研究认为复杂核型尤其是伴有单体型核型被认为是独立的预后不良的因素。Yanada M等[15]的报道也认为复杂核型尤其是单体型核型AML预后较差，缓解率在18%～48%，总生存率低于10%。

Stone RM[16]总结了AML中正常或异常核型与预后的关系，研究表明：年龄

≥60岁，预后差；细胞遗传学分析，正常核型5年生存率45%，t(15; 17)，t(8;21)

或inv（16） 5 年生存率65%，复杂核型尤其是复杂核型伴有单体型核型者如

-5/5q-, -7/7q-，5年生存率10-15%，其他如+8，+21，伴11q23重复、易位者，大多数为中间类型。分子生物学检测方面，FLT3-ITD，MLL-PTD，BAALC过表达，NPM1(-) / FLT3-ITD（+）或者FLT3-ITD(-), mRNA高表达，预后不良；而

CEBPA突变，NPM1(+) / FLT3-ITD(-)，C-kit(-) /t(8;21) or inv(16), FLT3-ITD(+)，

但无表达，预后较好。在主要为60岁以上的CK-AML患者中，带有3种或 3

种以上染色体畸变者只有10%～44%达到完全缓解（complete release, CR）。而

带有5种或5种以上染色体畸变者CR率更低，只有7%～26%。抗药性是造成低

CR率的主要原因，而且也是造成死亡率高的主要原因[5-8]。几乎所有的已经达到

CR的CK-AML患者会复发。CR期短，中位数为6个月～8个月。CR期达到3年的占0%～11%，达到5年的占0%～9%。在60岁以下CK-AML患者中，CR率稍高，但是远期预后还是非常差的[17]。

AML是一种复杂的异质性恶性肿瘤，对其预后因素的分析有助于决定适当的化疗方案。初诊时的核型检测提供了关键的预后信息，但是还需要详细划分。比如伴有各种基因突变及表达异常如C-KIT, FLT3, NPM1和CEBPA的核型类型，需要细分亚类，以更好地指导治疗，在这方面还存在争议。Schmid等[18]报道，CK-AML患者在第一次化疗缓解后早期给予异体造血干细胞移植，2年无病总生存率达到44% 和47%，也许这类患者的预后通过早期异体造血干细胞移植可得到改善。但是目前如何改善这类患者较差的预后仍然是临床上需要解决的难题[19]。

# 4. 复杂核型形成的机制

## **4.1** ***TP53***与复杂核型

复杂核型常常伴有多个不同染色体的畸变，这些异常包括未知位点的染色体不平衡易位，Marker染色体，环状染色体，均质染色区或双微体。通常CK-AMLs伴有染色体的获得或丢失，而不是平衡易位，提示其在白血病的发生中具有独特的机制。Lindvall C等[20]检测了15例伴有或不伴有CK的AML患者的转录本数据。结果显示：CK-AML与正常核型AML比较具有特异性表达的基因，包括位于5q，7q及控制细胞分裂的基因。作者还发现由于多种染色体重排引起的DNA的获得或减少导致基因以剂量依赖性的方式表达。这些数据提供了洞察多个染色体重排的机制，并进一步证明了的基因表达模式与AML核型的状态是密切相关的。

复杂核型形成的机制目前还不清楚，由于实体瘤细胞核型大多数为非整倍性，并且与TP53突变有关，因此大多数研究者认为复杂核型的形成与*TP53* 基

因突变有关。*TP53*因编码一种分子量为53 kDa的蛋白质而得名，是一种抑癌基因。其表达产物为基因调节蛋白即p53蛋白，DNA受损后，p53可参与DNA的修复过程；在细胞周期中，p53的调节功能主要体现在G1和G2/M期校正点的监测，与转录激活作用密切相关。Haferlach C等[21]首次报道了AML中*TP53*基因突变与复杂核型的关系。作者应用G显带技术及24色FISH技术检测了235例AML患者，107例伴有复杂核型，应用*TP53*特异探针检测*TP53*丢失，应用芯片及变性高效液相色谱法检测*TP53*外显子突变。结果：107例CK中，57例丢失*TP53*等位基因，保留的等位基因中有50例发生突变。50例未丢失*TP53*等位基因中，33例发生突变。因此总突变率为78%，235例AML组，总*TP53*突变：33/235(14%)，其中CK为29/42（69%），正常核型为4/193(2.1%)，正常核型中*TP53*突变率低。该研究提示*TP53*突变与复杂核型形成密切相关。2012年，Rucker FG[22]等分析了234例伴复杂核型的AML患者的*TP53*及其相关基因

的突变情况，CK-AML中*TP53*突变率为70%，**说明*TP53*异常在复杂核型形成**

**中起着重要的作用**。CK-AML中*TP53*突变率为70%，那么剩余的30%表达野生型*TP53*的AML患者，其复杂核型形成的机制又是如何？Medeiros BC[19]在对上述文献的评论中，指出Rucker等的工作非常有意义，正在开始揭开CK-AML患者白血病发生的分子机制，但是还有一些问题需要解决，比如占30%的具有野生型*TP53*的CK-AML发病中，是否是由于P53的负性调控因子鼠双微体基因2（mouse double minute 2, MDM2）或鼠双微体基因4（mouse double minute 4, MDM4）的作用引起？最近的一个报道[23]显示，骨髓增殖性疾 病

（Myeloproliferative disorders, MPN）进展为白血病过程中，18.18%患者可检测到位于1q上包括*MDM4*基因的扩增。而且这些扩增不伴有*TP53*异常。因此，其他P53调节因子如上游的ATM或下游MDM2是否参与其中？这个问题还没有得到充分的阐述。

## **4.2** **MDM2**和**MDM4**与复杂核型

P53信号通路是一个复杂的调控体系，MDM2和MDM4是其下游的调控因

子，遗传学的证据表明二者是P53重要的负性调节因子，由于*TP53*缺失导致的胚胎致死可以通过缺失*MDM2*或*MDM4*得到回复。图1是p53通路的简略图。p53-MDM2/MDM4是反馈环路是整个p53蛋白信号通路的中心。在正常条件下，细胞内p53蛋白含量和活性会长期维持在一个较低的水平。MDM2的作用是维持p53的低水平，MDM4则不依赖MDM2对p53产生抑制。MDM4抑制p53的转录水平。在各种具有致癌作用的应激反应发生时，p53蛋白含量上升，活性增强，激活或抑制多个下游靶基因，导致细胞凋亡和衰老，或者导致细胞周期暂时停滞，对DNA损伤进行修复。当细胞中MDM2/MDM4表达升高时，会抑制p53通路活性，含有损伤DNA的细胞继续进行分裂，造成细胞的非整倍性改变，导致细胞恶性转化，



图 1 p53信号通路简略图

*MDM2*是从一个自发转化的小鼠细胞系3T3-DM中克隆出来的一种高度扩增基因，在人类基因组中，*MDM2*定位于12q14.3-15，编码分子量为90 kDa的核蛋白，是p53调控网络中的下游靶基因。MDM2蛋白通过其N端的p53结合结构域与p53蛋白结合，抑制p53的转录活性；MDM2蛋白还作为泛素蛋白连接酶，结合p53并使其泛素化降解。MDM2转基因动物实验说明，MDM2可以促进细胞转化和具有成瘤性，*MDM2*在小鼠细胞系3T3-DM中高度扩增，在软琼脂上可以生长，裸鼠皮下成瘤速度也非常快[24]。将*MDM2*定向表达于小鼠的乳腺细胞，可导致小鼠乳腺癌的发生[25]。MDM2在1/3肉瘤高表达，这些肿瘤大部分表达野生型p53[26-28]，提示MDM2是细胞p53失活的一种分子机制，即

表达野生型p53的肿瘤中，MDM2高表达促进了野生型p53失活，使p53失去对细胞的监控作用，导致细胞恶性变，形成肿瘤。

MDM4是MDM2相关蛋白，最初是从小鼠表达文库中分离出来的与p53相互作用的蛋白[29]，人类的同源基因MDM4在1997[30]年被鉴定。MDM4定位于

1q32，有11个外显子，编码含490aa的蛋白质，其功能结构域从N端到C端依次为p53结合区域(24aa-108aa)、特定的酸性结构域(215aa-255aa)、锌指结构(300aa-328aa)以及RING (really interesting new gene)结构域（438aa-477aa）[31]

（图2）。MDM4不依赖MDM2对p53产生抑制，通过p53结合结构域与p53结合抑制p53的转录水平[32]。*MDM4*在一些实体肿瘤及其细胞系中扩增和高表达，特别是某些表达野生型p53肿瘤细胞中，通常伴随MDM4的高水平出现，如软组织肉瘤[33]、神经胶质瘤[34]、头颈鳞状细胞癌[35]等，提示MDM4高表达对p53通路的抑制作用。



图 2 MDM4 蛋白结构域[31]

*MDM4*基因除了全长转录本(MDM4 full length, MDM4-FL)外，目前已经发现有其他6种可变剪接转录本，分别是MDM4-S、MDM4-211、MDM4-A、MDM4-G、MDM4-XAltl、MDM4-XAlt2 [31]（图3）。

在*MDM4*可变剪接子中，MDM4S最常见。该剪接子缺失exon6，使得在

exon7上出现终止密码，翻译提前终止，形成了截短的MDM4S蛋白，该蛋白只保留了p53结合结构域。Lenos K等[36]的研究证实在骨肉瘤中，*MDM4-S*表达升高，MDM4-S/MDM4-FL蛋白比例升高，使得骨肉瘤进展并降低总生存率，结果提示：MDM4-S/MDM4-FL比例升高与MDM4全长蛋白表达降低有关，MDM4-S/MDM4-FL蛋白比例升高的同时，伴随MDM4全长蛋白水平的降低，

使得MDM2蛋白表达升高，造成p53泛素化降解增多，p53信号通路失活。Liu等[37]最近报道MDM4-S高表达是慢性淋巴细胞白血病预后差的分子标志，并且可作为潜在的治疗靶点。可见MDM4-S剪接体在恶性肿瘤中的作用越来越受到重视。



图 3 MDM4基因转录本。a表示MDM4基因的全长转录本MDM4-FL，

b 表示其他的6个可变剪接子[31]。

*MDM4*和*MDM2*分别编码490aa和491aa，二者最相似的结构是N端的p53结合结构域，通过此结构域与p53相互作用[38]。另一个保守的区域是位于C端的RING结构域，该结构域是MDM4-MDM2形成异二聚体所必需的。酵母双杂交实验显示MDM4与MDM2两种相关的蛋白在体内相互作用，并且形成的异二聚体很稳定[39,40]。p53在调控细胞周期和DNA复制和凋亡中起重要作用，也是非常有吸引力的肿瘤治疗的靶点之一。事实上，MDM4和MDM2均无法弥补其中之一在体内对p53的抑制，提示二者在抑制p53中各有重要的不相互重叠的作用。为什么p53需要两种结构相似的抑制因子？主要是二者抑制p53的机制不同。MDM2通过泛素化降解p53，而MDM4通过与p53结合，封闭p53的转录活性结构域，并不引起p53的降解[41-43]。

MDM2和DMD4对p53的抑制具有协同作用。最近的研究指出二者对p53

具有共同的调节机制，并不像之前认为二者是相互独立的。MDM2与MDM4 结

构上和功能上相互作用，MDM2在体外可形成同源二聚体，还可通过RING结构域与MDM4形成异二聚体。体外转染研究指出MDM4通过抑制MDM2的自泛素化降解作用稳定MDM2，然而MDM2可通过泛素化降解MDM4，其他研究显示MDM4可通过与MDM2竞争性结合p53富集p53抑制MDM2介导的p53降解[44]。MDM2和MDM4在p53调节上存在复杂的相互作用，在细胞内，二者主要以异二聚体的形式存在，而且，MDM2单独不足以激活E3泛素酶[45]，但是与MDM4形成异二聚体后E3泛素酶活性大大增强[46]。在小鼠中枢神经系统的研究也表明[47]，二者对p53 的抑制也具有协同效应。在该研究中，CNS 缺乏

MDM2的小鼠在胚胎发育12天时出现积水性无脑畸形，而缺乏MDM4则在胚胎17.5天出现脑发育畸形。有趣的是二者同时缺乏导致更早更严重的脑部畸形。所有这些表型缺失可以在同时缺失*TP53*基因时恢复正常。这些观察更支持在胚胎CNS发育过程中二者具有协同作用，体外和体内研究支持二者协同作用控制

p53的活性[48, 49]。虽然正如以上所说，二者协同作用有效抑制p53，二者还有独立的调节p53的功能，MDM4通过干扰p53与转录结构的相互作用，抑制p53的转录活性，而MDM2则促进p53的降解。

如前所述，伴复杂核型的AML *TP53*突变率达到70%，可见*TP53*突变与复杂核型关系密切。那么在表达野生型*TP53*的伴复杂核型的AML发生中，MDM2和MDM4是否起着重要的作用？最常见的具有野生型*TP53*而P53通路失活的机制是其抑制基因*MDM2*或*MDM4*高表达。至少在理论上，复活P53是有望治疗肿瘤的一个方法，目前的方法有：抑制MDM2/MDM4表达，封闭P53-

MDM2/MDM4相互作用和抑制MDM2泛素连接酶活性等。Samudio IJ[50]等认为，由于MDM2过表达造成表达野生型P53的AML患者p53通路失活，他们利用一种新型的MDM2抑制剂MI-63治疗这类患者，发现MI-63引起G1阻滞，P21表达升高以及细胞凋亡率升高，有趣的是MI-63还造成MDM4蛋白表达水平下降，他们的结果提示使用MI-63以及和传统的化疗药物合用对于AML治疗是值得尝试的。Bista M[51]等研究了MDM4抑制剂SJ-172550的作用机制，认为该化

合物通过复杂的机制，即可逆的共价结合封闭了MDM4并使之改变构象，不能与p53结合，并有多种因素参与使得构象稳定，从而释放p53，使p53恢复功能。Ovcharenko D[52]等研究发现在中等预后并且伴有NPM1突变的AML中，miR-10a高表达，*MDM4*基因为miR-10a的候选基因，二者呈现负相关关系。通过miR-10a和p53抑制因子MDM4的相互作用，有可能改变患者的生物学特性。该研究也表明了MDM4高表达在AML发病中的作用。Long J[53]等人采用MDM2抑制剂

MI219治疗109例AML患者，其中复杂核型36例（包括单体型5q-/7q-等），发现这部分患者中表达野生型P53的高危患者疗效较好，该研究间接说明了

MDM2在复杂核型患者中表达升高，在AML患者复杂核型的发生中起着重要的作用。

## 小 结

CK-AML发生率大约为成人AML的10%～15%，而且随着年龄的增长发病率逐渐升高，这类患者的化疗缓解率低，预后较差。最近应用SKY, M-FISH，位点特异探针FISH, a-CGH和分子遗传学技术已经能够详细了解CK-AML患者基因的复杂变化。对复杂核型形成机制方面的研究也更加深入，除了*TP53*基因突变因素外，表达野生型*TP53*患者的MDM2或MDM4高表达也开始引起人们的重视。一些针对MDM2或MDM4的小分子化合物也已经应用于临床，部分取得了较好的疗效。此外，MDM4的可变剪接体中MDM4-S的高表达，使得

MDM4S/MDM4FL比值升高，在某些肿瘤中作为一个较*TP53*突变更敏感的分子

Marker，提示患者早期转移和预后不良。随着分子生物学技术的不断进步，不仅能更详细了解患者白血病发生的生物学基础，而且有可能根据CK-AML患者不同的染色体丢失或基因改变而采取个体化的治疗方式。进一步研究基因变化的特征，开发出特定的靶向治疗方法，将有利于更好地改善伴复杂核型急性髓系白血病患者的预后。

参 考 文 献

[1] David Grimwade, Helen Walker, Fiona Oliver, Keith Wheatley, Christine Harrison, Georgina Harrison, John Rees, Ian Hann, Richard Stevens, Alan Burnett and Anthony Goldstone. The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML: Analysis of 1, 612 Patients Entered Into the MRC AML 10 Trial. Blood, 1998, 92(7): 2322-2333

[2] John C. Byrd, Krzysztof Mro´zek, Richard K. Dodge, Andrew J. Carroll, Colin

G. Edwards, Diane C. Arthur, Mark J. Pettenati, Shivanand R. Patil, Kathleen W. Rao, Michael S. Watson, Prasad R. K. Koduru, Joseph O. Moore, Richard M. Stone, Robert J. Mayer, Eric J. Feldman, Frederick R. Davey, Charles A. Schiffer, Richard A. Larson, and Clara D. Bloomfield. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction succes cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with *de novo* acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Blood,2002, 100(13):4325-4336.

[3] Mrozek K. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. Seminars in Oncology, 2008,35: 365-377 .

[4] Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH; Medical Research Council Adult Leukemia Working Party. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. Blood. 2001,98(5):1312-1320.

[5] Schoch C, Haferlach T, Haase D, Fonatsch C, Löffler H, Schlegelberger B, Staib P, Sauerland MC, Heinecke A, Büchner T, Hiddemann W; German AML

Cooperative Study Group. Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients. Br J Haematol. 2001,112(1):118-26.

[6] Cancer and Leukemia Group B 8461, Farag SS, Archer KJ, Mrózek K, Ruppert AS, Carroll AJ, Vardiman JW, Pettenati MJ, Baer MR, Qumsiyeh MB, Koduru PR, Ning Y, Mayer RJ, Stone RM, Larson RA, Bloomfield CD. Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and longterm outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. Blood. 2006,108(1):63-73.

[7] Fröhling S, Schlenk RF, Kayser S, Morhardt M, Benner A, DöhnerK, Döhner H; German-Austrian AML Study Group. Cytogenetics and age are major determinantsof outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B. Blood. 2006, 108 (10):3280-3288.

[8] van der Holt B, Breems DA, Berna Beverloo H, van den Berg E, Burnett AK, Sonneveld P, Löwenberg B. Various distinctive cytogenetic abnormalities in patients with acute myeloid leukaemia aged 60 years and older express adverse prognostic value: results from a prospective clinical trial. Br J Haematol. 2007,136(1):96-105.

[9] Schoch C, Kern W, Kohlmann A, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T. Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile. Genes Chromosomes Cancer. 2005,43(3):227-238.

[10] Van Limbergen H, Poppe B, Michaux L, Herens C, Brown J, Noens L, Berneman Z, De Bock R, De Paepe A, Speleman F. Identifica-tion of

Cytogenetic subclasses and recurring chromo-somal aberrations in AML and MDS with complex karyo-types using M-FISH. Genes Chromosomes Cancer. 2002,33(1):60-72.

[11] Schoch C, Haferlach T, Bursch S, Gerstner D, Schnittger S, Dugas M, Kern W, Löffler H, Hiddemann W. Loss of genetic material is more common than gain in acute myeloid leukemia with complex aberrant karyotype: a detailed analysis of 125 cases using conventional chromosome analysis and fluorescence in situ hybridization including 24-color FISH. Genes Chromosomes Cancer. 2002,35(1): 20-29.

[12] Mrózek K, Heinonen K, Theil KS, Bloomfield CD. Spectral karyotyping in patients with acute myeloid leukemia and a complex karyotype shows hidden aberrations, including recurrent overrepresentation of 21q, 11q, and 22q. Genes Chromosomes Cancer. 2002,34(2):137-153.

[13] Ferrara F, Palmieri S, Leoni F. Clinically useful prognostic factors in acute myeloid leukemia. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2008,66(3): 181-193

[14] Haferlach C, Alpermann T, Schnittger S, Kern W, Chromik J, Schmid C, Pielken HJ, Kreuzer KA, Höffkes HG, Haferlach T. Prognostic value of monosomal karyotype in comparison to complex aberrant karyotype in acute myeloidleukemia: a study on 824 cases with aberrant karyotype. Blood.2012, 119(9):2122-2125.

[15] Yanada M, Kurosawa S, Yamaguchi T, Yamashita T, Moriuchi Y, Ago H, Takeuchi J, Nakamae H, Taguchi J, Sakura T, Takamatsu Y, Waki F, Yokoyama H, Watanabe M, Emi N, FukudaT. Prognosis of acute myeloid leukemia harboring monosomal karyotype in patients treated with or without allogeneic hematopoietic cell transplantation after achieving complete remission.

Haematologica.2012,97(6):915-918.

[16] Stone RM. Prognostic factors in AML in relation to (ab) normal karyotype. Best Practice & Research Clinical Haematology 2009,22(4):523-528

[17] Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. Blood.1998,92(7): 2322-2333.

[18] Schmid C, Schleuning M, Ledderose G, et al. Schmid C, Schleuning M, Ledderose G, Tischer J, Kolb HJ. Sequential regimen of chemotherapy, reduced intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation, and prophylactic donor lymphocyte transfusion in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. J Clin Oncol.2005,23(24):5675- 5687.

[19] Medeiros BC. Unveiling the complexity of CK+AML. Blood. 2012,119(9): 1958-1959.

[20] Lindvall C, Furge K, Björkholm M, Guo X, Haab B, Blennow E, Nordenskjöld M, Teh BT. Combined genetic and transcriptional profiling of acute myeloid leukemia with normal and complex karyotypes Haematologica, 2004,89(9): 1072-1081

[21] Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. Leukemia, 2008,22(8):1539-1541

[22] Rücker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, Habdank M, Kugler CM, Holzmann K, Gaidzik VI, Paschka P, Held G, von Lilienfeld Toal M, Lübbert M, Fröhling S, Zenz T, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Lichter P, Döhner K, Döhner H. TP53 alterations in acute myeloid leukemia

With complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. Blood.2012,119(9):2114-2121

[23] Harutyunyan A, Klampfl T, Cazzola M, Kralovics R. p53 lesions in leukemic trans-formation. N Engl J Med.2011,364(5):488-490

[24] Cahilly-Snyder L, Yang-Feng T, Francke U, George DL. Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. Somat Cell Mol Genet. 1987,13(3):235-244.

[25] Lundgren K, Montes de Oca Luna R, McNeill YB, Emerick EP, Spencer B, Barfield CR, Lozano G, Rosenberg MP, Finlay CA. Targeted expression of MDM2 uncouples S phase from mitosis and inhibits mammary gland development independent of p53. Genes Dev. 1997,11(6):714-725.

[26] Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. Nature. 1992, 358(6381):80-83.

[27] Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. Nucleic Acids Res. 1998,26(15):3453-3459.

[28] Veerakumarasivam A, Scott HE, Chin SF, Warren A, Wallard MJ, Grimmer D, Ichimura K, Caldas C, Collins VP, Neal DE, Kelly JD. High-resolution array-based comparative genomic hybridization of bladder cancers identifies mouse double minute 4 (MDM4) as an amplification target exclusive of MDM2 and TP53. Clin Cancer Res.2008,14(9): 2527-2534.

[29] Shvarts A, Steegenga WT, Riteco N, van Laar T, Dekker P, Bazuine M, van Ham RC, van der Houven van Oordt W, Hateboer G, van der Eb AJ, Jochemsen AG. MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. EMBO J. 1996, 15(19): 5349-5357.

[30] Shvarts, A., Bazuine, M., Dekker, P., Ramos, Y. F., Steegenga, W. T., Merckx,

G., van Ham, R. C., van der Houven van Oordt, W., van der Eb, A. J. and Jochemsen, A. G.. Isolation and identification of the human homolog of a new p53-binding protein, Mdmx. Genomics,1997,43(1):34-42.

[31] Mancini F, Di Conza G, Moretti F. MDM4(MDMX) and its Transcript Variants. Curr Genomics. 2009,10(1):42-50.

[32] Marine JC, Dyer MA, Jochemsen AG. MDMX: from bench to bedside. Journal of Cell Science. 2006, 120(Pt 3), 371-378

[33] Bartel F, Schulz J, Böhnke A, Blümke K, Kappler M, Bache M, Schmidt H, Würl P, Taubert H, Hauptmann S. Significance of HDMX-S(or MDM4) mRNA splice variant overexpression and HDMX gene amplification on primary soft tissue sarcoma prognosis. Int J Cancer. 2005,117(3):469-475.

[34] Riemenschneider MJ, Büschges R, Wolter M, Reifenberger J, Boström J, Kraus JA, Schlegel U, Reifenberger G. Amplification and overexpression of the MDM4 (MDMX) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or MDM2 amplification. Cancer Res. 1999,59(24): 6091-6096.

[35] Valentin-Vega YA, Barboza JA, Chau GP, El-Naggar AK, Lozano G. High levels of the p53 inhibitor MDM4 in head and neck squamous carcinomas. Hum Pathol. 2007,38(10):1553-1562.

[36] Lenos K, Grawenda AM, Lodder K, Kuijjer ML, Teunisse AF, Repapi E, Grochola LF, Bartel F, Hogendoorn PC, Wuerl P, Taubert H, Cleton-Jansen AM, Bond GL, Jochemsen AG. Alternate splicing of the p53 inhibitor HDMX offers a superior prognostic biomarker than p53 mutation in human cancer. Cancer Res.2012,72(16):4074-4084.

[37] Liu L, Fan L, Fang C, Zou ZJ, Yang S, Zhang LN, Li JY, Xu W. S-MDM4 mRNA overexpression indicates a poor prognosis and marks a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. Cancer Sci. 2012,103(12):

2056-2063.

[38] Bottger, V., Bottger, A., Garcia-Echeverria, C., Ramos, Y. F., van der Eb, A. J., Jochemsen, A. G. and Lane, D. P.. Comparative study of the p53-mdm2 and p53-MDMX interfaces. Oncogene,1999,18(1):189-199.

[39] Sharp, D. A., Kratowicz, S. A., Sank, M. J., George, D. L.. Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. J. Biol. Chem. 274(53): 38189-38196.

[40] Tanimura, S., Ohtsuka, S., Mitsui, K., Shirouzu, K., Yoshimura, A., Ohtsubo,

M. MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. FEBS Lett.1999,447(1):5-9.

[41] Honda, R, Tanaka, H, Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. FEBS Lett. 1997,420(1): 25-27.

[42] Fang, S, Jensen, JP, Ludwig, RL, Vousden, KH, Weissman, AM. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. J Biol Chem. 2000, 275(12): 8945-8951.

[43] Pan, Y, Chen, J. MDM2 promotes ubiquitination and degradation of MDMX.

Mol Cell Biol. 2003,23(15): 5113-5121

[44] Pei D, Zhang Y, Zheng J. Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and MdmX. Oncotarget. 2012, 3(3): 228-235.

[45] Kawai, H, Lopez-Pajares, V, Kim, MM, Wiederschain, D, Yuan, ZM. RING domain-mediated interaction is a requirement for MDM2's E3 ligase activity. Cancer Res. 2007,67(13): 6026-6030.

[46] Linares, LK, Hengstermann, A, Ciechanover, A, Muller, S, Scheffner, M. HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003,100(21): 12009-12014.

[47] Xiong, S, Van Pelt, CS, Elizondo-Fraire, AC, Liu, G, Lozano, G. Synergistic

Roles of Mdm2 and Mdm4 for p53 inhibition in central nervous system development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006,103(9): 3226-3231.

[48] Wade, M, Wang, YV, Wahl, GM. The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. Trends Cell Biol. 2010,20(5): 299-309.

[49] Wang, X. p53 regulation: Teamwork between RING domains of Mdm2 and MdmX. Cell Cycle. 2011,10(24): 4225-4229.

[50] Samudio IJ, Duvvuri S, Clise-Dwyer K, Watt JC, Mak D, Kantarjian H, Yang D, Ruvolo V, Borthakur G. Activation of p53 signaling by MI-63 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells. Leuk Lymphoma. 2010,51(5): 911-919.

[51] Bista M, Smithson D, Pecak A, Salinas G, Pustelny K, Min J, Pirog A, Finch K, Zdzalik M, Waddell B, Wladyka B, Kedracka-Krok S, Dyer MA, Dubin G, Guy RK. On the mechanism of action of SJ-172550 in inhibiting the interaction of MDM4 and p53. PLoS One. 2012,7(6):e37518.

[52] Ovcharenko D, Stölzel F, Poitz D, Fierro F, Schaich M, Neubauer A, Kelnar K, Davison T, Müller-Tidow C, Thiede C, Bornhäuser M, Ehninger G, Brown D, Illmer T. miR-10a overexpression is associated with NPM1 mutations and MDM4 downregulation in intermediate-risk acute myeloid leukemia. Exp Hematol. 2011,39(10):1030-1042.

[53] Long J, Parkin B, Ouillette P, Bixby D, Shedden K, Erba H, Wang S, Malek SN. Multiple distinct molecular mechanisms influence sensitivity and resistance to MDM2 inhibitors in adult acute myelogenous leukemia. Blood. 2010, 116(1):71-80.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 附录 |  | |
|  | **中英文缩略词** |  |
| **简称** | **英文全称** | **中文全称** |
| aa | Amino acid | 氨基酸 |
| AML | Acute myelogenous leukemia | 急性髓系白血病 |
| BSA | Bovine serum albumin | 牛血清白蛋白 |
| CK-AML | Complex karyotype | 复杂核型 |
| CML | Chronic myelogenous leukemia | 慢性髓系白血病 |
| CR | Complete remission | 完全缓解 |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-Phenylindole | 4',6-二脒基-2-苯吲哚盐酸 |
| DEPC | Diethyl pyrocarbonate | 二乙基焦磷酰胺 |
| DMSO | Dimethyl sulphoxide | 二甲基亚砜 |
| EDTA | Ethylenediamine tetraacetic acid | 乙二胺四乙酸钠 |
| EB | Ethidium bromide | 溴化乙锭 |
| FBS | Fetal bovine serum | 胎牛血清 |
| FCM | Flow cytometery | 流式细胞术 |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate | 异硫氰酸荧光素 |
| FQ-RT-PCR | Fluorescence quantitative RT-PCR | 荧光定量 RT-PCR |
| MDM2 | Murine double minute gene 2 | 鼠双微体基因 2 |
| MDM4 | Murine double minute gene 4 | 鼠双微体基因 4 |
| MRD | Minimal residual disease | 白血病微小残留病灶 |
| NK-AML | Normal karyotype | 正常核型 |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis | 聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cell | 外周血单个核细胞 |
| PBS | Phosphate Buffered Solution | 磷酸盐缓冲溶液 |
| PCR | Ploymerase chain reaction | 聚合酶链式反应 |
| PI | Propidium Iodide | 碘化丙啶 |
| PR | Partial remission | 部分缓解 |
| RT-PCR | Reverse transcription polymerase chain reaction | 逆转录聚合酶链反应 |
| SDS | Sodium dodecyl sulphate | 十二烷基硫酸钠 |
| WB | Western-blot | 蛋白免疫印迹 |
| wt-p53 | Wild-type p53 | 野生型 p53 |
|  |  |  |

攻读学位期间发表文章情况

1. **Li Li**, Jianlan Li, Guoxia Li, Yanhong Tan, Xiuhua Chen, Fanggang Ren, Haixiu Guo, Hongwei Wang. A tetraploid minimally differentiated acute myeloblastic leukemia with extensive erythrophagocytosis: a case report and literature review. Int J Hematol. 2012, 96:801–805.

2. **李莉**， 殷丽天， 杨建一, 王文娟， 崔慧慧. ft西汉族正常人群ACE基因多态性

频率的分布.中国优生与遗传杂志.2009, 17(11)：14-15

3. **李莉**，马红莲，赵旭静，卜星彭， 王浩， 杨建一. 维生素C 和番茄红素对丙烯酰胺染毒小鼠淋巴细胞和肝细胞的氧化损伤. 毒理学杂志.2009, 23(5)：378-380

致 谢

在博士研究生的学习生活即将结束之际，心里有很多的不舍，回想四年来的点点滴滴，不禁感慨万千，在即将告别的时刻，我谨以最诚挚的感谢献给在此期间所有指导、关心、帮助我的老师、同学、朋友和亲人。

首先衷心感谢我的导师王宏伟教授在此期间对我的悉心指导和帮助。导师严谨的治学态度、渊博的知识、敏锐的科研洞察力使我受益匪浅。最难忘的是在课题设计方面，导师花费了大量的时间和精力，关心我的科研进展，课题进行过程中，遇到了很多难题，在数据庞杂的结果面前，导师总能从中找出关键问题之所在，点点滴滴的提醒和鼓励让我明确了研究方向。在科研态度上，导师甘于寂寞、实事求是、不懈追求真理的探索精神，定会让我受益终身。在毕业之际，我向导师致以最真挚的感谢和最衷心的祝福。

衷心感谢ft西医科大学第二医院血液科实验室覃艳红老师、徐智芳老师、陈秀花老师、任方刚老师、李国霞老师、李建兰老师、刘秀娥老师及中心实验室杨国华老师等在实验过程中的指导和帮助。

衷心感谢ft西医科大学第二医院血液科杨林花教授、乔振华教授及全体医护人员在查阅病历、随访病人等方面给予的指导和帮助。

衷心感谢课题组的覃艳红、陈秀花、徐智芳、任方刚、郭海秀、李然、齐喜玲、边思成、王晓娟、陈怡、梁冬，刘丹丹，许艾宁、张琳琳等同学，2009级博士同学邢爱萍，王艳红，关小明，马海岩等，我们曾经一起努力，同甘共苦，共度难关，你们不计回报，给了我无私的帮助，这份深厚的友谊会让我永远铭记在心。

衷心感谢苏州大学第一医院血液科陈苏宁教授，王谦博士在实验技术上的给予的无私指导和帮助。

衷心感谢ft西医科大学细胞生物与遗传学教研室杨建一教授、王文娟、张娟、师如意、刘铭、杜圣家、李彬彬等各位老师对我的支持和帮助。

衷心感谢ft西医科大学研究生院对我的培养，感谢ft西省优秀研究生创新基金的资助。

特别感谢我的父母和家人在读博期间给予我的支持、理解和关爱，让我能够专心学业，顺利完成课题。

最后衷心祝福在此期间所有给予我支持和帮助的老师、同学和朋友身体健康，开心快乐，事业顺利！

个人简历

**1、个人简介**

李莉，女，汉族，出生年月：1966.9，研究方向：血液病分子生物学，目前是ft西医科大学细胞生物与遗传学教研室教师，职称：副教授。在读期间获得

2011 年ft西省优秀研究生创新基金资助，并获得博士研究生国家奖学金。

**2、教育及工作经历**

1985年9月-1990年7月，ft西医科大学临床医学专业学习，本科，学士；

2000年9月-2003年7月，ft西医科大学遗传学专业学习，研究生，硕士，导师：杨建一教授；2007年9月-2008年6月，北京大学生命科学学院发育与遗传研究所，高级访问学者，导师：张博教授；2009年9月-今，ft西医科大学第二医院内科学专业，在读博士，导师：王宏伟教授。主要从事血液病分子生物学研究。主持省级基金一项，2012年获得校级基金2项：ft西医科大学创新基金及基础医学院331科技扶持基金。

[**MDM4S在急性髓系白血病中的表达及其在复杂核型形成中的作用**](http://d.wanfangdata.com.cn/Thesis_D331450.aspx)****

作者：[李莉](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?q=Creator%3a%22%e6%9d%8e%e8%8e%89%22%2BDBID%3aWF_XW)

学位授予单位：[ft西医科大学](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?q=School%3a%22%e5%b1%b1%e8%a5%bf%e5%8c%bb%e7%a7%91%e5%a4%a7%e5%ad%a6%22%2BDBID%3aWF_XW)

引用本文格式：[李莉](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?q=Creator%3a%22%e6%9d%8e%e8%8e%89%22%2BDBID%3aWF_XW)[MDM4S在急性髓系白血病中的表达及其在复杂核型形成中的作用](http://d.wanfangdata.com.cn/Thesis_D331450.aspx)[学位论文]博士2013