

# 慢性髓性白血病一种新剪接体 ABL<sup>Δexon7+35INS</sup> 的发现及其与酪氨酸激酶抑制剂耐药的相关性

潘杰 覃艳红 赵俊霞 陈秀花 徐智芳 许晶 常建梅  
薛凤 张娜 任方刚 张耀方 王晓娟 王宏伟

**【摘要】** 目的 探讨 ABL 基因的剪接体 ABL<sup>Δexon7</sup> 和 ABL<sup>35INS</sup> 是否与酪氨酸激酶抑制剂(TKI)耐药的发生有关。方法 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法结合 PCR 扩增产物直接测序法,检测 74 名健康人和 76 例慢性髓性白血病(CML)患者(TKI 治疗有效组 53 例,耐药组 23 例) ABL<sup>Δexon7</sup> 和 ABL<sup>35INS</sup> 剪接体的发生率。结果 发现并鉴定一种新的剪接体 ABL<sup>Δexon7+35INS</sup> (ABL<sup>Δexon7</sup> 和 ABL<sup>35INS</sup> 剪接体同时存在),在健康对照组、TKI 治疗有效组和耐药组检出率分别为 10.8% (8/74)、7.5% (4/53) 和 8.7% (2/23)。74 名健康对照者中 47 名 (63.5%) 表达 ABL<sup>Δexon7</sup> 剪接体, 8 名 (10.8%) 表达 ABL<sup>35INS</sup> 剪接体; 53 例 TKI 治疗有效的 CML 患者中 30 例 (56.6%) 表达 ABL<sup>Δexon7</sup> 剪接体, 5 例 (9.4%) 表达 ABL<sup>35INS</sup> 剪接体; 23 例发生耐药的 CML 患者中 12 例 (52.2%) 表达 ABL<sup>Δexon7</sup> 剪接体, 3 例 (13.0%) 表达 ABL<sup>35INS</sup> 剪接体, 比较以上各组结果, 差异均无统计学意义 ( $P$  值均  $> 0.05$ )。结论 新剪接体 ABL<sup>Δexon7+35INS</sup>、ABL<sup>Δexon7</sup> 和 ABL<sup>35INS</sup> 与 TKI 治疗发生耐药无关, 同时发现 ABL<sup>35INS</sup> 剪接体的发生往往会伴随外显子 7 的缺失。

**【关键词】** 剪接体; 酪氨酸激酶抑制剂; 耐药; 白血病, 髓系, 慢性, BCR-ABL 阳性; ABL<sup>Δexon7+35INS</sup>

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81400139); 山西省高等学校科技创新项目 (20141107); 山西省回国留学人员重点科研资助项目 (2015-重点 5); 山西省基础研究项目 (2013021034-3)

**Discovery of a novel spliceosome of ABL gene (ABL<sup>Δexon7+35INS</sup>) and its association with TKIs resistance in chronic myeloid leukemia** Pan Jie, Tan Yanhong, Zhao Junxia, Chen Xiuhua, Xu Zhifang, Xu Jing, Chang Jianmei, Xue Feng, Zhang Na, Ren Fanggang, Zhang Yaofang, Wang Xiaojuan, Wang Hongwei. Department of Hematology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Shanxi Key Laboratory of Molecular Diagnosis and Treatment of Blood Diseases, Taiyuan 030001, China  
Corresponding author: Wang Hongwei, Email: wanghw68@hotmail.com

**【Abstract】** Objective To explore whether the ABL<sup>Δexon7</sup> and ABL<sup>35INS</sup> spliceosome contributed to TKIs resistance. Methods Screening ABL<sup>Δexon7</sup> and ABL<sup>35INS</sup> in 74 normal people and 76 CML patients (53 patients in remission and 23 patients with TKIs resistance) by using polyacrylamide gel electrophoresis combined with cloning sequencing. Results A novel spliceosome ABL<sup>Δexon7+35INS</sup> (ABL<sup>Δexon7</sup> and ABL<sup>35INS</sup> existed at the same time) was identified and the mutation was detected in 8 (10.8%) of 74 normal people, 4 (7.5%) of 53 remission patients and 2 (8.7%) of 23 resistant patients. While 47 (63.5%) cases expressed ABL<sup>Δexon7</sup> and 8 (10.8%) cases expressed ABL<sup>35INS</sup> in 74 healthy people, 30 (56.6%) cases expressed ABL<sup>Δexon7</sup> and 5 (9.4%) cases expressed ABL<sup>35INS</sup> in 53 remission patients, 12 (52.2%) cases expressed ABL<sup>Δexon7</sup> and 3 (13.0%) cases expressed ABL<sup>35INS</sup> in 23 resistant patients. Three kinds of spliceosome in all groups had no statistical difference. Conclusion ABL<sup>Δexon7+35INS</sup>, ABL<sup>Δexon7</sup> and ABL<sup>35INS</sup> may be not uncommon in ABL gene and were unrelated to resistance in CML with TKIs treatment. ABL<sup>35INS</sup> were often accompanying with exon 7 deletion.

**【Key words】** Splicing; TKIs; Resistance; Leukemia, myeloid, chronic, BCR-ABL positive; ABL<sup>Δexon7+35INS</sup>

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81400139); Science and Technology Innovation Project in Universities of Shanxi Province (20141107); Key Project of Overseas Returnee Research of Shanxi Province (2015-key 5); Basic Research Project in Shanxi Province (2013021034-3)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.06.012

作者单位: 030001 太原, 山西医科大学第二医院血液病研究所、血液病分子诊疗山西省重点实验室

通信作者: 王宏伟, Email: wanghw68@hotmail.com

慢性髓性白血病(CML)是一种源于髓系造血干细胞克隆性异常的恶性血液病,以t(9;22)(q34;q11)染色体异常为特征,这一易位产生了BCR-ABL融合蛋白<sup>[1-3]</sup>。酪氨酸激酶抑制剂(TKI)为一类能抑制酪氨酸激酶活性的化合物,其出现大大提高了CML的疗效,明显延长CML患者的中位生存期,然而TKI耐药也是当今疾病治愈的一个关键性障碍。BCR-ABL激酶区的点突变目前被认为是CML患者发生TKI耐药的主要原因,二代或三代TKI的出现可以克服部分点突变引发的耐药问题,表现出比伊马替尼更卓越的疗效,但仍有28%的耐药患者检测不到ABL激酶区点突变<sup>[4-5]</sup>。

选择性剪接(Alternative Splicing, AS)是基因调节的重要形式,人类大约90%的基因都经历了这种剪接形式,且发现许多剪接体与不同肿瘤具有相关性<sup>[6-8]</sup>。多篇报道认为剪接体可作为潜在的肿瘤标志,也有研究者报道在CML耐药患者中可检测到外显子7缺失(ABL<sup>Δexon7</sup>)和第8、9外显子间35 bp插入(ABL<sup>35INS</sup>)。

我们采用聚丙烯酰胺凝胶电泳结合直接测序的方法分别检测健康对照组、TKI治疗有效组、耐药组CML样本中ABL<sup>Δexon7</sup>和ABL<sup>35INS</sup>发生情况,探讨其与CML耐药的相关性。

## 病例与方法

1. 病例:收集我院2014年1月至2015年12月血液科住院及门诊CML患者76例,所有患者经细胞形态学、免疫学、细胞遗传学、分子生物学检查确诊,诊断符合文献<sup>[9]</sup>标准。均接受TKI作为一线治疗。定期监测患者的分子生物学、遗传学及ABL激酶区突变。依据欧洲白血病网(ELN)最新指南<sup>[10]</sup>,诊断其中的23例发生耐药。74名健康正常人的外周血样本来自医院的体检中心。本研究获得我院伦理委员会批准,所有患者均知情同意。

2. 总RNA提取:取患者外周血或骨髓标本,用TRIzol试剂盒(日本TaKaRa公司产品)提取总RNA,用蛋白核酸分析仪检测260、280 nm处的吸光度(A)值,将A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>≥1.7的标本保存于-80℃备用。

3. 引物设计:从GeneBank检索ABL1序列(NM\_005157),应用primer5.0软件进行引物设计。采用巢式PCR进行扩增,扩增ABL的外侧PCR引物位于ABL第2外显子(ABL-F:5'-GGACCCAGT-GAAAATGACCC-3')和ABL第10外显子(ABL-R:

5'-TCCTGGAGGTCCTCGTCTTG-3'),内侧引物序列:ABL-2F:5'-CGGGAACCTCCTGGACTACC-3', ABL-2R:5'-CCCCACGGACGCCTTGT-3',引物位置见图1。



图1 引物位置设计示意图

4. 逆转录反应:取总RNA 1 μg、特异引物 2 μl (20 μmol/L),加DEPC水至11 μl,70℃5 min后立即冰浴,然后依次加入5×逆转录酶缓冲液4 μl、10 mmol/L dNTPs 2 μl、RNA酶抑制剂0.4 μl (50 U/μl),加DEPC水至19 μl,37℃5 min后冰浴,最后加M-MuLV逆转录酶1 μl (200 U),42℃60 min、70℃10 min,-20℃保存。

5. PCR:扩增体系25 μl:10×Taq 2.5 μl, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μl,上、下游引物(20 mmol/L)各1 μl, MgCl<sub>2</sub> (1.5 mmol/L) 1.5 μl, cDNA 2.0 μl, Taq DNA polymerase (1 U/μl) 1.5 μl, 双蒸水补充至25 μl。样本在95℃的热变性仪中扩增,95℃2 min预变性,95℃30 s、58℃70 s、72℃70 s (30个循环)。第二轮扩增退火温度为59℃,时间降为30 s。每次扩增均设立阳性、阴性和空白对照。PCR产物采用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行电泳,用UVP凝胶成像仪对电泳结果进行扫描分析。

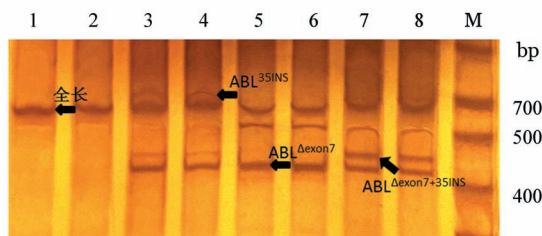
6. 测序:将目的产物切胶纯化,并送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

7. 统计学处理:采用SPSS17.0软件进行数据处理。计数资料比较用χ<sup>2</sup>检验、Fisher确切概率法。P<0.05为差异有统计学意义。

## 结果

1. ABL<sup>Δexon7+35INS</sup>剪接体的发现:在ABL剪接体的检测过程中,我们在扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图上,除已知存在的两种剪接体ABL<sup>Δexon7</sup> (408 bp)和ABL<sup>35INS</sup> (628 bp),还发现一种新的条带(大小在400~500 bp)(图2中7、8泳道示),将此目的条带回收并克隆测序,鉴定为ABL基因的一种新剪接体,即同时存在Δexon7和35INS两种剪接体,命名为ABL<sup>Δexon7+35INS</sup>,测序结果见图3。

2. ABL<sup>Δexon7</sup>、ABL<sup>35INS</sup>及ABL<sup>Δexon7+35INS</sup>剪接体在各组中的发生率:我们分别检测了健康对照组、TKI治



1、2:扩增产物全长; 3、4: ABL<sup>35INS</sup>; 5、6: ABL<sup>Δexon7</sup>; 7、8: ABL<sup>Δexon7+35INS</sup>; M: Marker

图2 ABL基因剪接体扩增产物电泳图(箭头所示为各剪接体位置)

疗有效组及耐药组中 ABL 基因各剪接体的发生率, ABL<sup>Δexon7</sup> 的发生率分别为 63.5% (47/74)、56.6% (30/53) 及 52.2% (12/23), 各组间差异无统计学意义 ( $P=0.552$ )。ABL<sup>35INS</sup> 在 CML 耐药组和治疗有效组中的发生率分别为 13.0% (3/23) 和 9.4% (5/53), 健康对照组为 10.8% (8/74), 差异亦无统计学意义 ( $P=0.895$ )。

我们同样在三组患者中对 ABL<sup>Δexon7+35INS</sup> 剪接体进行了检测与统计分析, 结果发现, 这一剪接体在耐药组 8.7% (2/23) 的样本中可检出, 治疗有效组为 7.5% (4/53), 健康对照组为 10.8% (8/74), 且均处于较低的表达水平, 统计学分析显示这一剪接体在三组中的表达差异无统计学意义 ( $P=0.927$ )。

## 讨论

选择性剪接作为调节基因表达和产生蛋白质

组多样性的重要手段, 与包括白血病在内的各种肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[8]</sup>。CML 患者除 ABL 区点突变外, 常见报道的有 ABL<sup>Δexon7</sup> 和 ABL<sup>35INS</sup>, 本研究中, 我们发现了一种新的剪接体 ABL<sup>Δexon7+35INS</sup>, 此剪接体是 ABL<sup>35INS</sup> 剪接体的主要存在形式, 发生率达到 87.5% (14/16), 这提示 ABL<sup>35INS</sup> 剪接体的发生往往会伴随外显子 7 的缺失, 单一 35 bp 插入的发生比例较低。由于既往各个研究组在检测 ABL<sup>35INS</sup> 剪接体时, 为提高检出率只设计针对其的引物进行小片段扩增, 故无法判断有无外显子 7 的缺失, 导致了这一新剪接体的漏检。三种剪接体可同时存在于同一 CML 患者中, 也可分别在不同患者中表达, 不同剪接体比例是否与 TKI 耐药表型相关, 还有待于后续实验继续研究。

ABL 基因选择性剪接现象与 CML 耐药的关系是近些年研究的热点。2007 年 Curvo 等<sup>[11]</sup>首次报道了 ABL 基因由于选择性剪接出现的第 7 外显子缺失转录本 ( $\Delta$ exon7), 作者在 7 例临床 TKI 耐药的 CML 患者中检测到 5 例存在这一转录本, 认为其与 CML 的耐药有相关性。而 Gaillard 等<sup>[12]</sup>则在初诊与耐药 CML 患者中进行了此剪接体表达的比较, 认为在两组中差异无统计学意义, 质疑了耐药发生时 ABL<sup>Δexon7</sup> 的参与。2008 年 Lee 等<sup>[13]</sup>报道了 ABL 基因激酶区第 8 和第 9 外显子间 35 bp 插入的剪接体 (ABL<sup>35INS</sup>), 指出发生伊马替尼耐药的程度取决于 ABL<sup>35INS</sup> 表达水平, 并且构建分子动力学模型说明 ABL<sup>35INS</sup> 引起了蛋白构象的变化。随后, Santamaria

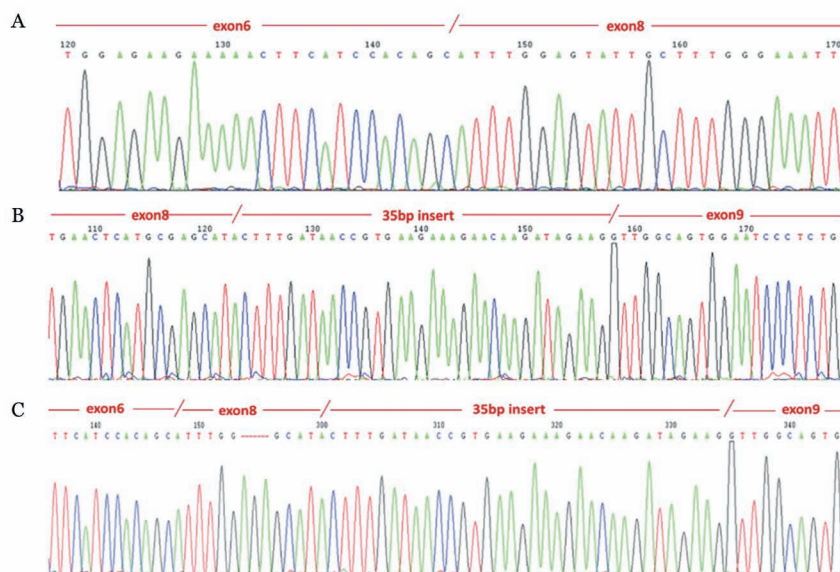


图3 ABL<sup>Δexon7</sup>(A)、ABL<sup>35INS</sup>(B)及 ABL<sup>Δexon7+35INS</sup>剪接体(C)测序图



等<sup>[14]</sup>指出 ABL<sup>35INS</sup> 在正常人中也有表达,且发现一些对伊马替尼治疗反应不佳并且没有发生 ABL 突变的 CML 患者并没有 ABL<sup>35INS</sup> 的表达,有 1 例患者,换成达沙替尼治疗后,随着 BCR-ABL 表达下降,ABL<sup>35INS</sup> 的表达却有较高的上升,因此认为 ABL<sup>35INS</sup> 为 ABL 基因中的一种常见现象,与耐药无关。本研究中我们检测了 74 名正常人和 76 例 CML 患者 ABL<sup>Δexon7</sup> 和 ABL<sup>35INS</sup> 和 ABL<sup>Δexon7+35INS</sup> 的发生情况,结果表明三种剪接体的发生率三组间差异均无统计学意义,这与 Gaillard 等<sup>[12]</sup>和 Santamaria 等<sup>[14]</sup>的报道一致。

BCR-ABL 激酶区的点突变作为 CML 患者获得性耐药的机制得到了广泛的研究和报道<sup>[15]</sup>,相比之下,选择性剪接与耐药的关系以及功能学分析还在探索中。目前研究证实 ABL<sup>Δexon7</sup> 和 ABL<sup>35INS</sup> 均为 ABL 基因的选择性剪接类型,其存在比例的改变所产生的功能性意义尚有待进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, et al. The biology of chronic myeloid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(3):164-172.
- [2] Bedi A, Zehnbauser BA, Barber JP, et al. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia[J]. *Blood*, 1994, 83(8):2038-2044.
- [3] Cambier N, Chopra R, Strasser A, et al. BCR-ABL activates pathways mediating cytokine independence and protection against apoptosis in murine hematopoietic cells in a dose-dependent manner[J]. *Oncogene*, 1998, 16(3):335-348. doi: 10.1038/sj.onc.1201490.
- [4] Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(24):2260-2270. doi: 10.1056/NEJMoa1002315.
- [5] Kantarjian HM, Shah NP, Cortes JE, et al. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION)[J]. *Blood*, 2012, 119(5):1123-1129. doi: 10.1182/blood-2011-08-376087.
- [6] Chen J, Weiss WA. Alternative splicing in cancer: implications for biology and therapy[J]. *Oncogene*, 2015, 34(1):1-14. doi: 10.1038/ncr.2013.570.
- [7] Oltean S, Bates DO. Hallmarks of alternative splicing in cancer[J]. *Oncogene*, 2014, 33(46):5311-5318. doi: 10.1038/ncr.2013.533.
- [8] Maciejewski JP, Padgett RA. Defects in spliceosomal machinery: a new pathway of leukaemogenesis[J]. *Br J Haematol*, 2012, 158(2):165-173. doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09158.x.
- [9] 中华医学会血液学分会. 中国慢性髓性白血病诊断与治疗指南(2013年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2013, 34(5):464-470. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2013.05.021.
- [10] Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet[J]. *Blood*, 2006, 108(6):1809-1820. doi: 10.1182/blood-2006-02-005686.
- [11] Curvo RP, Zalcberg IR, Scholl V, et al. A recurrent splicing variant without c-ABL Exon 7 in Imatinib-resistant patients[J]. *Leuk Res*, 2008, 32(3):508-510. doi: 10.1016/j.leukres.2007.04.018.
- [12] Gaillard JB, Arnould C, Bravo S, et al. Exon 7 deletion in the bcr-abl gene is frequent in chronic myeloid leukemia patients and is not correlated with resistance against imatinib[J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(11):3083-3089. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0595.
- [13] Lee TS, Ma W, Zhang X, et al. BCR-ABL alternative splicing as a common mechanism for imatinib resistance: evidence from molecular dynamics simulations[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(12):3834-3841. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0482.
- [14] Santamaria I, Pitiot AS, Balbin M. ABL alternative splicing is quite frequent in normal population - letter[J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(3):772; author reply 772. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0078.
- [15] Drake JM, Lee JK, Witte ON. Clinical targeting of mutated and wild-type protein tyrosine kinases in cancer[J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(10):1722-1732. doi: 10.1128/MCB.01592-13.

(收稿日期:2015-12-25)

(本文编辑:王叶青)