·论著·

外周血样本的存储和运输对BCR-ABL（P210）转录本水平定量检测结果的影响

华明强[1,2]　何娜[1]　钟朝琴[1,3]　杨新雨[1]　刘金婷[1]　王锐卿[1]　韩凤姣[1]　张琛[1]　马道新[1]
[1]山东大学齐鲁医院血液科，济南　250012；[2]山东大学齐鲁医院急诊科，济南　250012；
[3]山东省烟台山医院血液科，烟台　264000
通信作者：马道新，Email：daoxinma@sdu.edu.cn

【摘要】 目的　探索慢性髓性白血病（CML）患者外周血样本的存储和运输对实时定量PCR（RQ-PCR）检测BCR-ABL（P210）转录本水平的影响。**方法**　采集84例CML患者外周血样本，根据储存时间（0、6、12、24、48和72 h）、温度［室温（18～24 ℃）和低温（2～8 ℃）］以及振荡条件（振荡时长3、6和12 h）设置不同分组，RQ-PCR法检测不同条件下外周血样本BCR-ABL（P210）转录本水平。本研究将BCR-ABL拷贝数、ABL拷贝数和BCR-ABL（P210）转录本水平等原始数据进行对数转化（$\log_{10}^{N}$）。**结果**　①琼脂糖凝胶电泳结果显示：室温条件下，储存48、72 h的样本RNA出现显著降解；②储存温度方面，总体样本中，室温储存48、72 h的样本BCR-ABL拷贝数检测水平显著低于低温储存的样本（$P<0.05$）；然而BCR-ABL（P210）转录本水平在低温储存与室温储存条件下检测结果差异无统计学意义（$P>0.05$）；③储存时间方面，与基线的3.35±1.60相比，总体样本的BCR-ABL拷贝数检测结果仅在室温储存储存下48 h（2.93±1.59）和72 h（2.79±1.42）显著下降（$P<0.05$）；与基线的5.47±0.35相比，总体样本中ABL拷贝数检测结果在48 h（低温5.29±0.30，室温5.06±0.38）和72 h（低温5.11±0.54，室温4.64±0.79）均显著下降（$P<0.05$）。但是，与基线的−0.56±1.51相比，无论低温或室温条件下，不同储存时间（6、12、24、48和72 h）的样本BCR-ABL（P210）转录本水平检测结果无显著改变（$P>0.05$）；④振荡方面，与基线的−0.60±1.37相比，振荡3、6、12 h的样本BCR-ABL（P210）转录本水平检测结果无显著改变（$P>0.05$）。**结论**　样本储存时间、储存温度及运输振荡因素可以影响BCR-ABL、ABL拷贝数的检测结果，但对BCR-ABL（P210）转录本水平定量检测结果无显著影响。

【关键词】 实时聚合酶链反应；　融合蛋白质类，BCR-ABL；　室内质量控制；　存储条件；　运输

DOI：10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.03.008

The influence of peripheral blood sample storage and delivery on the quantitative detection result of BCR-ABL（P210）transcript levels

Hua Mingqiang[1,2], He Na[1], Zhong Chaoqin[1,3], Yang Xinyu[1], Liu Jinting[1], Wang Ruiqing[1], Han Fengjiao[1], Zhang Chen[1], Ma Daoxin[1]

[1]Department of Hematology, Qilu Hospital, Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan, Shandong, 250012, China; [2]Department of Emergency Medicine, Qilu Hospital, Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan, Shandong, 250012, China; [3]Department of Hematology, Yantai Mountain Hospital, Yantai, Shandong 264000, China

【Abstract】 Objective　To explore the influence of storage and delivery conditions of the peripheral blood samples from patients with chronic myeloid leukemia（CML）on the real-time quantitative PCR（RQ-PCR）detection of the BCR-ABL（P210）transcript levels. **Methods**　The peripheral blood samples of 84 CML patients were collected. The same sample was divided into different groups according to storage time（0, 6, 12, 24, 48, and 72 h）, temperature（room temperature, 18－24 ℃; low temperature, 2－8 ℃）, and vibration conditions（3, 6, and 12 h）. RQ-PCR was used to detect BCR-ABL（P210）transcript levels of the different groups. This study logarithmically transformed（$\log_{10}^{N}$）the original data［BCR-ABL copy number, ABL copy number, and BCR-ABL（P210）transcript levels］. **Results**　① Agarose gel electrophoresis showed significant RNA degradation of samples after storage for 48 and 72 h at room temperature. ② Among the overall samples, the BCR-ABL copy number of the samples stored at room

temperature for 48 and 72 h was significantly lower than that of the samples stored at low temperature ($P<0.05$). However, the BCR-ABL (P210) transcript levels had no significant difference between samples stored at low temperature and room temperature. ③No significant changes were noted in the BCR-ABL (P210) transcript levels at different storage times (6, 12, 24, 48, and 72 h) regardless of storage temperature ($P>0.05$) compared with that at baseline (0 h, −0.56±1.51). ④ The BCR-ABL copy number of the overall sample only decreased significantly ($P<0.05$) at 48 h (2.93±1.59) and 72 h (2.79±1.42) compared with that at baseline (0 h, 3.35±1.60) when stored at room temperature. The ABL copy number in the overall sample decreased significantly at 48 and 72 h (whether low and room temperature; $P<0.05$). However, no significant changes were noted in the BCR-ABL (P210) transcript levels after vibration for 3 h (−1.29±1.81), 6 h (−1.24±1.72), and 12 h (−1.18±1.68; $P>0.05$) compared with that at baseline (0 h, −0.60±1.37). **Conclusion** Sample storage time, storage temperature, and vibration can interfere with the results of BCR-ABL and ABL copy number but have no significant effect on the quantitative determination of BCR-ABL (P210) transcript levels. This study provides strong support for the feasibility of transregional transportation of peripheral blood samples from patients with CML.

【Key words】 Real-time quantitative polymerase chain reaction; Fusion proteins, BCR-ABL; Internal quality control; Storage conditions; Delivery

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.03.008

慢性髓性白血病(CML)是一种克隆性骨髓增殖性恶性肿瘤,费城染色体(Ph)和BCR/ABL(P210)融合基因是CML诊断和疗效评估的金标准[1]。近年来酪氨酸激酶抑制剂(TKI)极大地改善了CML患者的无进展生存(PFS)期[2-3],NCCN和欧洲白血病监测网(ELN)指南建议应用RQ-PCR定期监测BCR-ABL(P210)转录本水平,有利于进行TKI疗效评估和预后判断[4-5]。国内外诸多单位通过获得转换系数(CF),将各实验室的检测结果换算成国际标准化(IS)的BCR-ABL(P210)转录本水平,使不同实验室之间的检测结果具有可比性[6]。然而,由于试剂、仪器、人员、技术和环境等诸多因素影响,RQ-PCR检测结果有诸多不确定性,缺乏可重复性[7-9]。同时,没有BCR-ABL(P210)转录本水平检测能力的医疗机构需将CML患者外周血标本储存并运输到相应的检测机构进行检测。目前储存时间、温度和运输过程中的振荡等环境因素对BCR-ABL(P210)转录本水平检测结果的影响尚缺乏研究。本研究我们探索了样本储存和运输条件(储存时间、温度和振荡)对RQ-PCR检测BCR-ABL(P210)转录本水平的影响,现报道如下。

对象与方法

一、研究对象

本研究共采集84例CML(慢性期)患者的外周血标本。患者中位年龄48(16~81)岁,男47例,女37例,其中15例为初诊患者,另69例在样本采集时已接受TKI治疗18(1~60)个月。CML的诊断及分期依据《中国慢性髓性白血病诊断与治疗指南(2016年版)》[10]。利用转换系数(CF)将BCR-ABL(P210)转录本水平的原始数值转换为BCR-ABL(P210)^{IS},根据BCR-ABL(P210)^{IS}数值,将样本分为两个亚组:高表达组(IS>0.1%)和低表达组(IS≤0.1%)。本研究得到山东大学齐鲁医院医学伦理委员会的批准,依据赫尔辛基宣言,所有纳入研究的患者入组前均签署知情同意书。

二、样本采集和处理

采集患者外周血10 ml,EDTA抗凝。选取2016年5月至2016年7月连续于山东大学齐鲁医院就诊的49例CML患者(低表达组19例,高表达组30例)样本,每份样本平均分装到11个无菌试管(0、1A、2A、3A、4A、5A、1R、2R、3R、4R、5R)中:试管0的样本采样后立即进行红细胞裂解提取白细胞,作为基线样本;试管1A~5A置于室温(18~24 ℃)存放,分别于6、12、24、48和72 h后进行红细胞裂解提取白细胞;试管1R~5R置于低温(2~8 ℃)存放,分别于6、12、24、48和72 h后进行红细胞裂解提取白细胞。另选取2016年8月至2016年10月于山东大学齐鲁医院就诊的35例CML患者(低表达组12例,高表达组23例)样本,每份样本平均分装到4个无菌试管(0、1V、2V、3V)中,试管0立即提取白细胞,试管1V~3V放置在滚轴摇床上,分别于振荡后3、6和12 h后提取白细胞。取上述各条件分离的白细胞,用1 ml TRIzol充分溶解,提取总RNA,置于−80 ℃超低温冰柜储存待检。

三、总RNA提取和质量控制

每批次样本按照实验室标准操作规程提取总RNA。所有实验耗材(微量移液器、吸头和Ep管

等)要求无RNase,样品在低温离心机中处理。获得总RNA后,用分光光度计(德国Eppendorf公司)测量RNA浓度和纯度,琼脂糖凝胶电泳验证总RNA的完整性。

四、RQ-PCR检测BCR-ABL(P210)转录本水平

BCR-ABL(P210)的转录本水平检测按照上海源奇生物医药科技有限公司的BCR-ABL P210融合基因检测试剂盒说明书进行操作。PCR扩增体系为:总RNA 1000 ng、PCR反应液4.8 μl、酶混合物1.2 μl,加RNA-Free水补充至总体积15 μl。利用ABI7500荧光定量PCR仪进行扩增反应,反应条件:42 ℃ 30 min;94 ℃ 5 min;94 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,40个循环;37 ℃ 1 min。反应结束后,阈值设定为5000,根据标准曲线,用ABI 7500软件(V1.3)计算出待测标本的BCR-ABL(P210)和ABL的拷贝数。BCR-ABL(P210)转录本水平以BCR-ABL拷贝数/ABL拷贝数×100%×转换系数(IS)表示,本实验室转化系数为0.36。

五、统计学处理

使用SPSS 21.0进行统计分析。将BCR-ABL拷贝数、ABL拷贝数和BCR-ABL(P210)转录本水平等原始数据进行对数转化($\log_{10}^{N}$),转化后数据均符合或近似符合正态分布,以均数±标准差表示。采用重复测量方差分析进行组间比较。双侧$P<0.05$表示差异有统计学意义。

结　果

一、储存时间和温度对样本总RNA质量的影响

选取3份CML患者外周血样本,在室温和低温下储存0~72 h,提取总RNA,通过琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性,利用分光光度计检测总RNA的纯度和质量。结果显示,与基线相比,低温条件下储存的样本,6、12、24、48和72 h后均无明显的RNA降解;然而,室温条件下,48和72 h两个时间点的样本RNA降解出现显著(图1)。

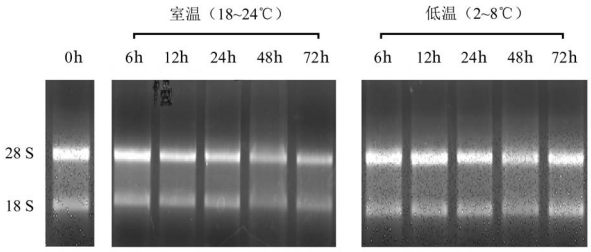


图1　储存时间和温度对慢性髓性白血病患者外周血样本RNA质量的影响

二、储存温度对BCR-ABL(P210)检测结果的影响(图2)

总体样本中,室温储存48、72 h的样本BCR-ABL拷贝数检测水平显著低于低温储存的样本($P<0.05$);高表达组样本中,室温储存24、48和72 h样本的BCR-ABL拷贝数检测水平显著低于低温储存样本($P<0.05$);而低表达组样本中,室温或低温条件储存对BCR-ABL拷贝数检测结果无明显影响($P>0.05$)。室温储存48、72 h后,总体和亚组(低表达或高表达)样本中ABL拷贝数检测水平均显著低于低温储存样本($P<0.05$)。然而,储存不同时间后,样本的BCR-ABL(P210)转录本水平在低温储存(6 h:−0.54±1.50;12 h:−0.41±1.41;24 h:−0.45±1.49;48 h:−0.55±1.53;72 h:−0.39±1.43)与室温储存(6 h:−0.53±1.48;12 h:−0.49±1.52;24 h:−0.58±1.53;48 h:−0.58±1.49;72 h:−0.37±1.33)条件下检测结果差异均无统计学意义($P>0.05$)。

三、储存时间对BCR-ABL(P210)检测结果的影响(图3)

在低温储存条件下,与基线(3.35±1.60)相比,总体样本中BCR-ABL拷贝数检测结果在不同时间点(6、12、24、48及72 h)无显著改变($P>0.05$);而在室温储存条件下,与基线(3.35±1.60)相比,总体样本的BCR-ABL拷贝数检测结果在48 h(2.93±1.59)和72 h(2.79±1.42)显著下降($P<0.05$)。进一步分析发现,室温储存条件下,与基线(4.39±1.05)相比,高表达组样本BCR-ABL拷贝数检测结果在48 h(3.92±1.02)和72 h(3.43±1.21)显著下降($P<0.05$),而低表达组样本BCR-ABL拷贝数在不同时间点无明显变化。另外,与基线(5.47±0.35)相比,总体样本中ABL拷贝数检测结果在48 h和72 h(低温和室温)均显著下降($P<0.05$)。进一步分析发现,与总体样本中的趋势一致,室温储存48 h和72 h,低表达组和高表达组的ABL拷贝数检测结果均较基线水平显著下降($P<0.05$),而低温条件下仅高表达组72 h时间点ABL拷贝数检测结果与基线结果差异有统计学意义($P<0.05$)。与基线(−0.56±1.51)相比,无论低温或室温条件下,BCR-ABL(P210)转录本水平在储存不同时间点(6、12、24、48和72 h)的样本中检测结果无显著改变($P>0.05$);同样,与基线水平相比,低表达组和高表达组样本各时间点BCR-ABL(P210)转录本水平检测结果差异无统计学意义。

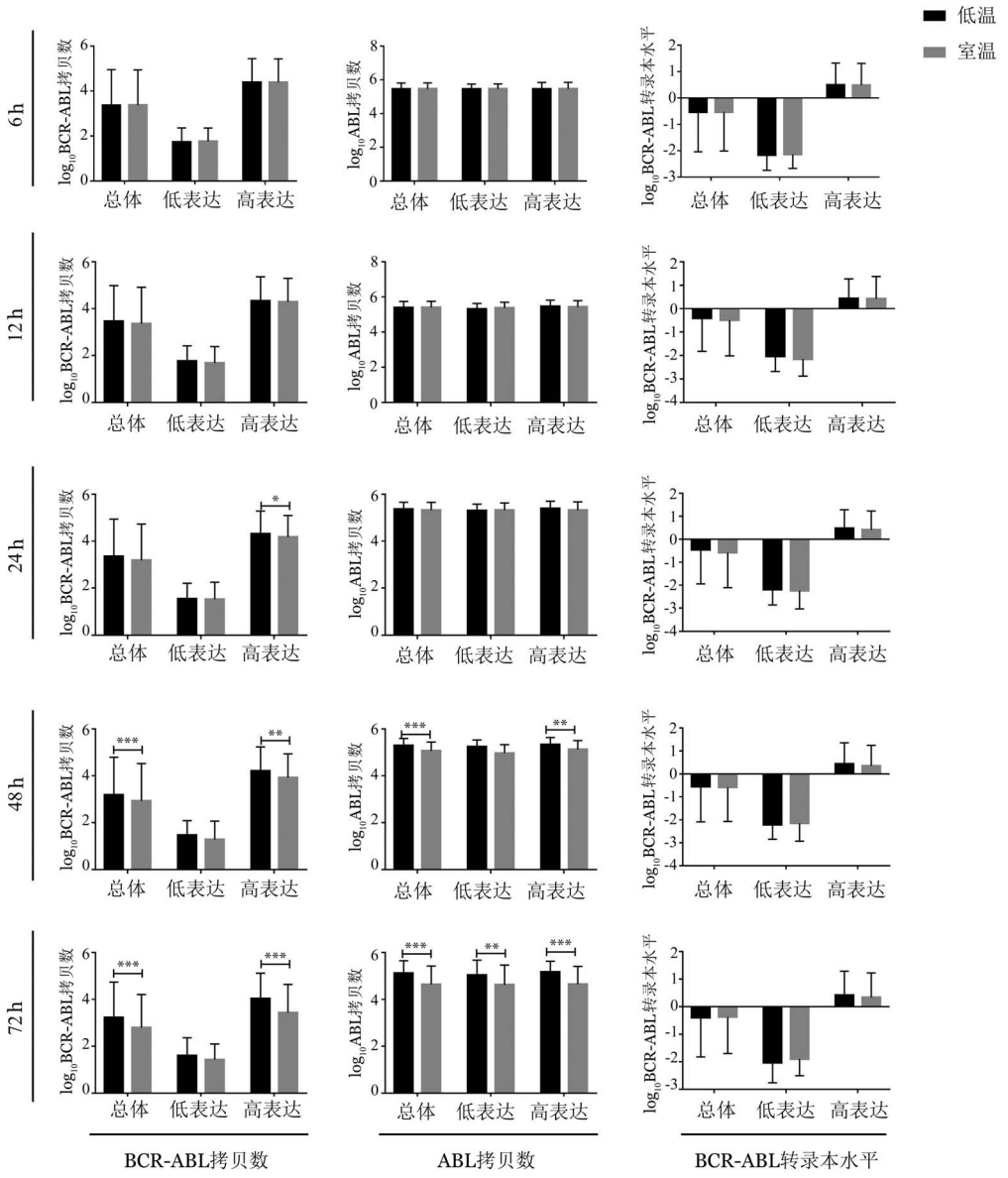


图2 储存温度对慢性髓性白血病患者外周血样本BCR-ABL(P210)检测结果的影响

四、运输振荡对BCR-ABL(P210)检测结果的影响(图4)

我们进一步研究运输振荡对BCR-ABL(P210)检测结果的影响,发现与基线样本(5.53±0.33)相比,振荡12 h后,总体样本的ABL拷贝数(5.69±0.30)显著升高($P<0.05$),而振荡3、6及12 h后,BCR-ABL拷贝数、BCR-ABL(P210)转录本水平与基线检测结果相比差异均无统计学意义($P>0.05$)。进一步分析发现,低表达组和高表达组的BCR-ABL拷贝数、ABL拷贝数及BCR-ABL(P210)转录本水平在振荡3、6及12 h后均无显著改变($P>0.05$)。

讨 论

CML是以BCR-ABL(P210)融合基因为特征的血液系统恶性肿瘤,对BCR-ABL(P210)融合基因的定量检测对CML患者的诊断和治疗至关重要。本研究探索了CML患者外周血样本的储存温度、时间及运输中的振荡等环境因素对BCR-ABL(P210)融合基因检测结果的影响,对于明确CML标本跨区域运输的可行性具有一定参考价值。

为了减少系统误差,本研究由经验丰富的技术人员依据实验室标准流程进行总RNA提取及RQ-PCR检测[11]。此外,本实验室已建立RQ-PCR检测

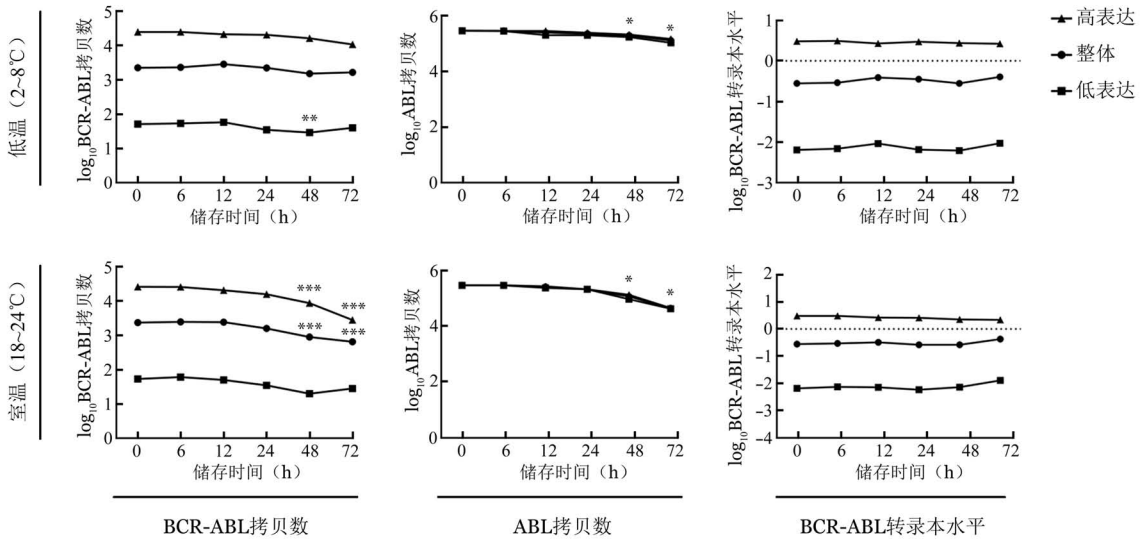
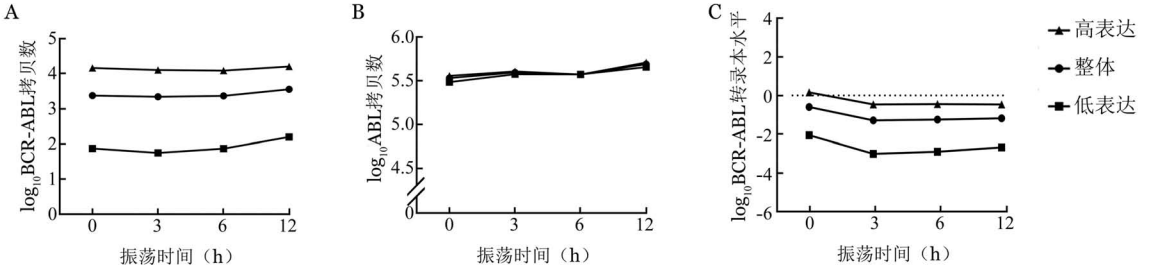


图3　储存时间对慢性髓性白血病患者外周血样本BCR-ABL(P210)检测结果的影响



A:log10 BCR-ABL拷贝数;B:log10 ABL拷贝数;C:log10BCR-ABL转录本水平

图4　运输振荡对慢性髓性白血病患者外周血样本BCR-ABL(P210)检测结果的影响

BCR-ABL(P210)转录本水平的长期室内质控体系，本研究检测结果依据质控标准进行评估[12]。

据文献报道，无论冷藏与否，血液样品的运输对总RNA的质量和产量均无明显影响[13]。我们发现血液样本在室温或低温储存24 h时RNA不会出现明显的降解，而在室温储存48 h后会发生降解，为保证提取的RNA质量，建议样本放置不要超过24 h。另外，Wang等[14]对2例CML患者样本的研究发现，与基线水平相比，BCR-ABL(P210)与内参基因(G6PD、GUSB和ABL2)的表达水平均随时间延长而显著降低。本研究对49例CML患者样本应用RQ-PCR进行检测，结果表明，BCR-ABL(P210)拷贝数或ABL拷贝数亦随储存时间延长而逐渐降低，但二者受储存时间的影响程度略有不同:BCR-ABL(P210)拷贝数在室温储存24 h、低温储存48 h的样本中出现显著下降，而ABL拷贝数在室温或低温储存48 h的标本中才会出现明显降低。同时，我们分析了样本储存温度对BCR-ABL(P210)或ABL拷贝数结果的影响，发现BCR-ABL(P210)或ABL拷贝数与样本储存温度也存在一定的关系。与室温相比，冷藏更有利于CML患者外周血样本的保存。此外，我们研究了振荡对BCR-ABL(P210)检测结果的影响，发现振荡因素可升高BCR-ABL(P210)和ABL的拷贝数，推测可能是振荡增加了白细胞与空气的接触，促进了基因的表达。储存温度、时间及振荡因素会干扰CML患者外周血样本的BCR-ABL(P210)或ABL基因的拷贝数检测结果，但其作用的机制尚不明确。此外，本研究发现，BCR-ABL(P210)转录本水平未明显受到储存温度、时间及振荡因素的影响，其原因可能是外界因素造成BCR-ABL(P210)拷贝数和ABL拷贝数的同时升高或降低，导致二者比值基本没有变化。

CML患者应用TKI治疗有效后，BCR-ABL(P210)转录本水平逐渐降低，其主要是由于BCR-ABL(P210)拷贝数的下降，而ABL基因的表达相对稳定。为了探讨存储和运输因素对不同BCR-ABL(P210)转录本水平的影响，我们依据CML患者外周血样本基线的BCR-ABL(P210)^{IS}转录本水平，将

标本分为高表达组和低表达组，发现外界因素对BCR-ABL（P210）、ABL拷贝数的影响在两个亚组样本之间基本一致，BCR-ABL（P210）转录本水平未受到样本储存时间、温度及振荡因素的干扰。尽管这些因素不影响BCR-ABL（P210）/ABL比值变化，但是ABL拷贝数的降低会导致BCR-ABL（P210）拷贝数为0样本的检测敏感性下降，从而影响深层次分子学反应的评估。

目前，全世界各地的实验室使用多种内参基因检测BCR-ABL（P210）转录本水平，包括ABL、GUSB、GAPDH和B2M[15-16]，但作为BCR-ABL（P210）定量内参基因的ABL在当前临床实践中已被广泛使用。本研究以ABL作为内参基因，证实BCR-ABL（P210）转录本水平未明显受到样本储存温度、时间和振荡等因素的干扰。但使用其他内参基因的检测结果是否会受到外界因素的影响，尚不明确。此外，本研究未观察CML患者有核细胞提取后溶于TRIzol后冻存于−80 ℃冰箱的时间对BCR-ABL、ABL拷贝数和BCR-ABL（P210）转录水平的影响，应在后面研究中进一步探索。总之，本研究证明了CML患者外周血样本在室温和低温条件存放72 h内，BCR-ABL（P210）转录本水平检测结果保持稳定。但鉴于室温条件下保存24 h后BCR-ABL（P210）和ABL检测的拷贝数减少，以及振荡亦会干扰BCR-ABL（P210）和ABL的拷贝数，我们建议CML外周血样本跨区域运输应在冷藏条件下进行，同时减少振荡，并尽量在CML患者样本采集后24 h内进行总RNA的提取和BCR-ABL（P210）转录水平的检测。

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. DOI: 10.1056/NEJM199907153410306.

[2] Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Talpaz M, et al. Imatinib mesylate therapy may overcome the poor prognostic significance of deletions of derivative chromosome 9 in patients with chronic myelogenous leukemia[J]. Blood, 2005, 105(6): 2281-2286. DOI: 10.1182/blood-2004-06-2208.

[3] Pophali PA, Patnaik MM. The Role of New Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia[J]. Cancer J, 2016, 22(1):40-50. DOI: 10.1097/PPO.0000000000000165.

[4] O'Brien S, Radich JP, Abboud CN, et al. Chronic myelogenous leukemia, version 1.2015[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2014, 12(11):1590-1610. DOI: 10.6004/jnccn.2014.0159.

[5] Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(35):6041-6051. DOI: 10.1200/JCO.2009.25.0779.

[6] 秦亚溱, 林振兴, 岑建农, 等. 用于转换国际标准的BCR-ABL（P210）转录本水平的转换系数多中心确认研究[J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(02):134-137.

[7] Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential[J]. Biotechniques, 1999, 26(1):112-122, 124-125. DOI: 10.2144/99261rv01.

[8] Keilholz U, Willhauck M, Rimoldi D, et al. Reliability of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)-based assays for the detection of circulating tumour cells: a quality-assurance initiative of the EORTC Melanoma Cooperative Group[J]. Eur J Cancer, 1998, 34(5):750-753. DOI: 10.1016/s0959-8049(97)10105-8.

[9] Bustin SA, Benes V, Nolan T, et al. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective[J]. J Mol Endocrinol, 2005, 34(3):597-601. DOI: 10.1677/jme.1.01755.

[10] 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（2016年版）[J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(8):633-639. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.08.001.

[11] Nussbaumer C, Gharehbaghi-Schnell E, Korschineck I. Messenger RNA profiling: a novel method for body fluid identification by real-time PCR[J]. Forensic Sci Int, 2006, 157(2-3):181-186. DOI: 10.1016/j.forsciint.2005.10.009.

[12] 钟朝琴, 何娜, 华明强, 等. 实时定量PCR检测BCR-ABL（P210）转录本水平室内长期质控体系的建立及应用[J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(9):800-806. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.09.014.

[13] Malentacchi F, Pizzamiglio S, Wyrich R, et al. Effects of Transport and Storage Conditions on Gene Expression in Blood Samples[J]. Biopreserv Biobank, 2016, 14(2):122-128. DOI: 10.1089/bio.2015.0037.

[14] Wang YL, Lee JW, Cesarman E, et al. Molecular monitoring of chronic myelogenous leukemia: identification of the most suitable internal control gene for real-time quantification of BCR-ABL transcripts[J]. J Mol Diagn, 2006, 8(2):231-239. DOI: 10.2353/jmoldx.2006.040404.

[15] Moravcová J, Rulcová-Karavdić J, Broučková A, et al. Effect of the duration and quality of peripheral blood sample storage on the results of qualitative and quantitative BCR-ABL transcript analyses in patients with CML[J]. Leuk Res, 2011, 35(7):e121-122. DOI: 10.1016/j.leukres.2011.03.022.

[16] Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)-a Europe against cancer program[J]. Leukemia, 2003, 17(12): 2474-2486. DOI: 10.1038/sj.leu.2403136.

（收稿日期：2020-07-05）

（本文编辑：刘爽）