

证的研究

慢性粒细胞白血病融合基因与中医分型探讨

张 励¹ 魏艾红¹ 王 伟¹ 黄世林¹ 杨英选² 康洁霓²

摘要 目的:探讨慢性粒细胞白血病(CML)患者BCR/ABL融合基因表达与中医辨证分型的关系。方法:采用筑巢式RT-PCR方法,扩增30例CML患者BCR/ABL融合基因,从分子生物学角度探讨其与中医分型的关系。结果:气阴两虚型与瘀血痰结型患者BCR/ABL基因阳性率明显高于毒热炽盛型($P<0.01$),经过治疗后,瘀血痰结型BCR/ABL基因阳性率高于气阴两虚型($P<0.05$)。结论:90%以上的CML患者都具有BCR/ABL融合基因的表达,该融合基因是实验室诊断指标之一,其表达与变化为指导CML中医辨证诊治提供了客观指标。

主题词 白血病,粒-单核细胞,慢性/遗传学 辨证分型

Study on Relationship between of Fusion Gene and TCM Syndrome Classification in the Patient of Chronic Myelogenous Leukemia

Zhang Li, Wei Aihong, Wang Wei, et al.

(No. 210 Hospital of PLA, Dalian 116021)

Objective: To study on relationship between of BCR/ABL fusion gene expression and TCM syndrome classification in the patient of chronic myelogenous leukemia (CML). **Methods:** Nest-building RT-PCR method was used for amplification of BCR/ABL fusion gene in 30 cases of CML, so as to explore the relationship between gene and TCM syndrome classification from the perspective of molecular biology. **Results:** The positive rate of BCR/ABL gene in the patient with both qi and yin deficiency, and the patient of intermingled phlegm and blood stasis was significantly higher than that in the patient of intense noxious heat type ($P<0.01$). After treatment, the positive rate of BCR/ABL gene in the patient of intermingled phlegm and blood stasis was higher than that in the patient with both qi and yin deficiency ($P<0.05$). **Conclusion:** Over 90% patients of CML have expression of BCR/ABL fusion gene, which is a laboratory index for diagnosis of CML, and its expression and changes are an objective index for guiding diagnosis and treatment of CML.

Key Words Leukemia, granulocytic-mononuclear cell, chronic/genetics; Syndrome classification

90%以上的慢性粒细胞白血病(CML)患者具有由于9号与22号染色体易位而形成的ph染色体,从而产生BCR/ABL融合基因,该基因对CML的诊断、微小残留病灶的检测、预防疾病的复发都具有重要意义。我们对30例CML患者进行了BCR/ABL融合基因的检测,以探讨BCR/ABL融合基因与中医临床证型之间的关系。

1 临床资料

选择2002年6月以来中国人民解放军第二一〇医院中医血液病研究所收治的30例CML患者,男16例,女14例;慢性期23例,急变期5例,缓解期1例,部分缓解期1例。诊断均符合第二届全国白血病治疗讨论会(1989)FAB分型标准。

2 方法

2.1 中医证候临床分型方法:参照文献[2,3],根据2001年中华中医药学会内科学会血液病专业委员会制定的白血病中医证型诊断标准分为以下3型。

气阴两虚型:常见疲乏无力,可见贫血、面色苍白、头晕,低热、五心烦热,自汗、盗汗,纳呆、腹胀,或有月经不调,舌质淡红或暗淡、淡紫,舌体胖嫩有齿痕,舌苔薄白,脉象多滑或轻弦、细弦、沉细等;外周血象:白细胞 $\leq 10.0 \times 10^9/L$,血红蛋白 $< 120g/L$,血小板正常或偏低,白血病细胞 $< 5\%$ 或消失;骨髓象:增生活跃或达骨髓缓解或受抑,原幼细胞 $< 20\%$ 。

毒热炽盛型:发病较快,常见发热,骨痛,鼻衄、齿龈及黏膜出血,皮肤出血点、瘀斑,可见贫血,心悸气短,溺血,便秘,舌质暗紫,常有瘀点、瘀斑,以及舌背下静脉怒张,脉象滑数或弦数等,部分病例可出现肝脾进行性增大,常伴发胁下痞块胀痛,甚者痞块剧痛、拒按,发热等;外周血象:白细胞总数 $> 10.0 \times 10^9/L$,常呈进

1 中国人民解放军第二一〇医院中医血液病研究所,辽宁省大

连市西岗区胜利路94-2号210021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 中国人民解放军沈阳军区卫生人员训练基地

收稿日期:2005-03-20;修回日期:2005-06-15

行性增高,或减低 $>2.0 \times 10^9/L$,原始粒+早幼粒细胞 $>30\%$,或原淋+幼淋、或原单+幼单 $>20\%$,血红蛋白 $<105g/L$,血小板降低;骨髓象:骨髓增生极度活跃,原、幼细胞 $>30\%$,慢性白血病原粒+幼粒细胞 $\geq 50\%$,或原淋+幼淋、或原单+幼单 $>20\%$,嗜碱粒细胞增多。

瘀血痰结型:发病缓慢,常见胁下痞块,肝脾肿大,颈、腋及腹股核结聚,淋巴结肿大,骨痛,可见发热,鼻衄、齿衄、皮肤及黏膜出血,贫血,心悸气短,疲乏无力,舌质淡暗或紫暗,常有瘀斑,舌苔厚腻,脉象弦滑,舌背下静脉怒张等;外周血象:白细胞总数增高 $>10.0 \times 10^9/L$ 或减低 $<4.0 \times 10^9/L$,原始细胞 $\leq 5\%$,或查到嗜酸或嗜碱细胞增高和各期幼稚细胞,血红蛋白 $<105g/L$,血小板降低;骨髓象:增生极度活跃,原、幼细胞增多 $\geq 30\%$ 。

2.2 实验方法及观察指标:RNA 提取:取骨髓 3~5ml,用 Ficoll 液分离出单个核细胞, -80°C 保存备用。采用 TRIzol 试剂(GIBCO 公司)一步法提取细胞总 RNA。cDNA 合成:20 μL 总反应体系,总 RNA 0.5 μg , $5 \times \text{RAV-2Buffer}$ 4 μL , dNTP 4 μL , RNase Inhibitor 20 U, 随机引物 50 pmol, AMV RT-XL 5U, 室温放置 10 分钟后移入 42°C 水浴 1 小时,置 -20°C 备用。筑巢式 PCR 扩增:引物序列参见文献[1], 50 μL 总反应体系,含 cDNA 4 μL , $10 \times$ 缓冲液 5 μL , DNTP 3 μL (2.5mm), 引物各 50 pmol, Tag 聚合酶 2U, PCR 反应条件 93°C 1 分钟, 60°C 1 分钟, 73°C 1 分钟,二轮循环各 30 个周期, K562 细胞做阳性对照,阴性对照为正常人及水管。PCR 产物检测:取 12 μL 二次 PCR 反应产物, 2% 琼脂糖凝胶电泳, FSW 凝胶呈像分析系统检测结果。观察指标:电泳结果出现 125bp 电泳带即为 BCR/ABL 基因表达阳性。

2.3 统计学方法:数据处理应用 χ^2 检验。

3 结果

30 例 CML 患者中,气阴两虚型 14 例,毒热炽盛型 5 例,瘀血痰结型 11 例。初次检查 BCR/ABL 融合基因,阳性表达者中,气阴两虚型 12 例,阳性率为 85.7%;毒热炽盛型 1 例,阳性率为 20%;瘀血痰结型 9 例,阳性率为 81.8%。气阴两虚型与瘀血痰结型基因阳性率差异无显著性,但均高于毒热炽盛型($P < 0.01$)。经过一段时间治疗后,气阴两虚型中,有 4 例患者持续阳性,阳性率为 33.3%,其余 8 例中,3 例转为阴性,5 例骨髓受抑,未查到 BCR/ABL 基因;瘀血痰结型中 8 例患者持续阳性,阳性率为 88.9%,其融合基因阳性率明显高于气阴两虚型($P < 0.05$)。

4 讨论

CML 是起源于造血干细胞的克隆性增殖性疾病,90%以上的患者具有特异性的 ph 染色体,从而产生 BCR/ABL 融合基因,该融合基因的存在是实验室诊断指标之一,用筑巢式 PCR 方法可使检测敏感度达 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ 水平,当临床处于缓解期时 BCR/ABL 融合基因可持续阳性,说明患者还没有达到真正(分子水平)的缓解。

中医学认为,白血病是由于正气虚损,邪毒内侵,深至骨髓,内耗精血,阴阳失调,正气衰败,易遭外邪,终致正虚邪实之证。CML 融合基因的阳性表达从分子水平上证实了邪实内存。由于白血病细胞克隆性增殖,机体阴阳平衡严重失调,在临床上呈现出毒热炽盛、瘀血痰结、气阴两虚的不同证型。气阴两虚型患者乏力、五心烦热,外周血白细胞减少,伴贫血及血小板减少,骨髓处于缓解或受抑。BCR/ABL 基因阳性率为 85.7%,经治疗后基因阳性率有所下降,其“阴虚则内热”,虽骨髓象好转,但伏邪内存,阴精不足,稍遇外感风寒或放弃巩固治疗均可复发。毒热炽盛型患者高热,外周血白细胞总数增高,骨髓原始及早幼细胞过高,多为治疗初期及慢性期转为急性变的患者。BCR/ABL 基因在此型时已由阳性转为阴性,出现非特异染色体,此为疾病发展到一定阶段而“重寒则热,重热则寒”,“重阴必阳,重阳必阴”,该型基因转变可为中医逆证,病势预后不良。瘀血痰结型患者舌暗紫,面色黧黑,肝脾肿大,外周血白细胞明显增高,骨髓增生极度活跃。BCR/ABL 基因阳性率为 81.8%,经治疗后基因阳性表达率仍很高,提示其瘀血内滞,损耗机体真阳,“阳虚则外寒”,此期治宜重力祛邪,活血化瘀,清热解毒,直达骨髓,促使骨髓象好转。气阴两虚及瘀血痰结型患者中有 6 例因骨髓受抑而检测不到 BCR/ABL 基因,有 3 例从阳性转为阴性,中医视为顺证。骨髓内白血病细胞及正常造血细胞同时减少,基因表达减弱,疾病由里至表,临床仍有乏力、五心烦热、贫血、脾大等症状,但毒邪祛半,治宜扶正祛邪,滋阴补肾,温阳健脾。

通过 CML 基因与中医分型的探讨,从更深层次上认识了中医分型的意义,而基因检测能提供更加准确的诊断依据,为指导 CML 中医辨证治疗提供了客观标准,为进一步治愈 CML 奠定了实验基础。

参考文献

- 1 郑维扬,周淑芸,王小琪,等.筑巢式 PCR 检测白血病微量残留 bcr/abl mRNA.中华血液学杂志,1994,15(5):227~229.
- 2 孟景春,周仲瑛.中医诊断学.第 3 版.北京:人民卫生出版社,1989:85~115.
- 3 李明富.中医内科学.北京:中国中医药出版社,2000:105~123.