

成人急性髓性白血病 SOCS-1 基因及其甲基化的研究

庄衍 程毅敏 汪雷 窦红菊 朱琦 胡钧培[△]

(上海交通大学医学院附属第九人民医院 血液科 上海 200011)

摘要 目的 通过检测成人急性髓性白血病中 SOCS-1 基因表达水平及其甲基化水平,研究其在白血病发病中的作用。方法 运用甲基化特异性 PCR(Methylation specific PCR, MSP)方法,对 24 例急性髓性白血病患者和 4 株白血病细胞株(Jurkat、Raji、U 937、NALM 17),进行 SOCS-1 基因甲基化水平的研究,同时运用 Real-time PCR 法定量分析 SOCS-1 基因表达水平。以 10 例健康人为正常对照组。结果 24 例成人急性髓性白血病患者中,15 例有 SOCS-1 基因甲基化(62.5%),而正常对照组无 SOCS-1 基因甲基化(0%),二者有显著差异($P<0.05$)。SOCS-1 基因甲基化组与无 SOCS-1 基因甲基化组相比较,其 SOCS-1 基因相对表达量明显减少($P<0.05$)。与患者临床病理特征相结合比较,发现 SOCS-1 基因的甲基化与患者年龄、性别和病程阶段无相关。4 株白血病细胞株中, Jurkat 和 U 937 表现有 SOCS-1 甲基化(50%), Raji 和 NALM 17 无 SOCS-1 甲基化,前者 SOCS-1 基因表达量较后者也明显降低($P<0.05$)。结论 SOCS-1 基因在成人急性髓性白血病中甲基化水平明显增高,且 SOCS-1 基因甲基化后表达水平受到抑制,提示 SOCS-1 基因及其甲基化在急性髓性白血病的发生发展中可能具有一定作用。

关键词 SOCS-1 基因;甲基化;急性髓性白血病

中图分类号 R733.71 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)18-3417-04

The Methylation of SOCS-1 Gene in Adult Acute Myeloid Leukemia

ZHUANG Yan, CHENG Yi-min, WANG Lei, DOU Hong-ju, ZHU Qi, HU Jun-pei[△]

(Department of Hematology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University Medical School, Shanghai 200011 China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of SOCS-1 (Suppressor of Cytokine Signalling-1) in tumorigenesis of adult acute myeloid leukemia (AML) by detecting the methylation state and expression of SOCS-1 gene. **Methods:** A total of 24 patients with AML, 10 healthy volunteers and 4 cell lines (Jurkat, Raji, U 937, NALM 17) were chosen. The methylation state of SOCS-1 in samples and cell lines were detected by using methylation-specific polymerase chain reaction (MSP), and the expression of SOCS-1 was detected by using Real-time PCR. **Results:** The aberrant methylation of SOCS-1 was 62.5% (15/24) in primary patients with AML. In contrast, there was no aberrant methylation of SOCS-1 gene in normal samples ($P<0.05$). The expression of SOCS-1 in AML patients with aberrant methylation of SOCS-1 gene was lower than that in AML patients without aberrant methylation of SOCS-1 gene ($P<0.05$). There was no relation between the methylation of SOCS-1 gene and the clinicopathological data (such as sex, age and tumor stage). **Conclusion:** The methylation of SOCS-1 gene in AML was higher than that in control group significantly ($P<0.05$), and aberrant methylation strongly correlates with reduced expression. SOCS-1 gene may play an important role in tumorigenesis of AML.

Key words: SOCS-1(Suppressor of Cytokine Signalling-1); AML(acute myeloid leukemia); methylation

Chinese Library Classification(CLC): R733.71 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)18-3417-04

前言

细胞因子信号转导抑制因子-1(SOCS-1)是上世纪 90 年代发现的能抑制细胞因子信号转导的蛋白,它与多种疾病的发生发展都有关系。SOCS-1 通过作用于细胞因子信号转导通路(主要是 JAK/STAT 通路),负反馈调节细胞因子的信号转导^[1,2]。在人类肿瘤的发生发展中,基因的甲基化也是原因之一^[3]。2001 年, Yoshikawa H 等首先报道在肝细胞性肿瘤(HCC)中发现 SOCS-1 基因 CpG 岛被高度甲基化而失活,而将未甲基化的 SOCS-1 转染到 HCC 细胞株,可以抑制其生长并促进其凋亡^[4]。

白血病作为一类造血干细胞的克隆性恶性疾病,在全国各年龄组恶性肿瘤的死亡率中分别占第六位(男性)和第八位(女性);在儿童和 35 岁以下成人中占第一位。白血病的发病机理和病因非常复杂,至今仍不完全清楚。

目前,对于 SOCS-1 基因及其甲基化水平的研究报道不多,本文拟运用甲基化特异性 PCR(MSP)方法,对成人急性髓性白血病(AML)进行 SOCS-1 基因甲基化水平的研究,并且通过 Real-time PCR 定量分析法检测 AML 中 SOCS-1 基因表达,探讨 SOCS-1 基因在 AML 发病中可能存在的作用,对今后的治疗提供一个新的方向。

1 资料与方法

1.1 病例选择

于 2004 年 7 月~2005 年 12 月间收集 AML 24 例,符合 FAB 诊断和分型标准。其中男性 13 例,女性 11 例,年龄 18-76

作者简介:庄衍(1975-),硕士,研究方向:socs-1 基因与血液系统肿瘤的关系,电话:021-23271699-5752, E-mail: yan.z1975@163.com
[△]通讯作者:胡钧培,教授,电话:021-23271699-5752,
E-mail: Hujunpei90@hotmail.com
(收稿日期:2011-05-28 接受日期:2011-06-22)

岁。AML 包括初发和复发。采集标本(外周血)前二周,患者均未进行过治疗。对照组为健康成人 10 例。所有病例排除其它肿瘤性疾病、免疫性疾病、糖尿病和肥胖症。

1.2 细胞株

Raji(B 淋巴细胞系)、Jurkat(T 细胞系)、U937(粒细胞系)、NALM 17(原始 B 细胞系)血液系统肿瘤细胞株来自于上海血液学研究所,所有细胞系均在含 10%FBS 及抗生素(100U/ml 青霉素、100μg/ml 庆大霉素)的 RPMI 1640 培养液中(Hy-clone)在 5%的 CO₂、37℃的孵箱中培养。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 抽提 经过肝素抗凝的外周血,经 Ficoll 液分离出单个核细胞,采用华舜生物工程公司 DNA 抽提试剂盒,按照试剂盒操作步骤抽提 DNA,并用分光光度仪测定 DNA 浓度。细胞株也用上述方法抽提 DNA。

1.3.2 DNA 亚硫酸氢钠修饰 抽提后 DNA 按照 James G 等的方法^[5]稍加改进进行亚硫酸氢钠修饰。

1.5-2μg DNA 加入 0.2M NaOH 变性处理,37℃水浴 15 分钟,加入新鲜配制 30μl 10mM 对苯二酚,520ul 3M 亚硫酸氢钠(PH=5.0)混匀,加入矿物油,50℃水浴 16 小时。修饰后的 DNA 用 Wizard DNA Clean-up System 试剂盒(Promega, USA)提纯,再加入 0.3M NaOH,37℃水浴 15 分钟;在混合物中加入 1μl 10mg/ml 糖原、17μl 10M 醋酸铵及 3 倍体积无水乙醇,-20℃过夜;乙醇洗涤后重悬,-20℃储存备用。

1.3.3 甲基化特异性 PCR 反应(MSP) 亚硫酸氢钠修饰后的 DNA 采用 HotStarTaq® DNA Polymerase(QIAGEN)进行甲基化特异性 PCR 反应扩增^[4]。

根据参考文献^[4]设计引物,并由英骏生物技术有限公司(Invitrogen Biotechnology Co. Ltd)合成。每条引物合成 5 OD。

SOCS-1 甲基化反应引物:

S(sense) 5'-TTCGCGTGTATTTTATAGTCGGTC-3'

AS(antisense) 5'-CGACACAACCTACAACGACCG-3'

SOCS-1 非甲基化反应引物:

S (sense) 5'-TTATGAGTATTTGTGTGTATTTTATAG-GTTGGTT-3'

AS (antisense) 5'-CACTAACAACACAACCTCTACAA-CAACCA-3'

PCR 反应体系:10× buffer 2.5 μl, 5mM dNTP 1 μl, 10μM Primer Mixture 1 μl, 4μg/μl HotStar Taq 酶 1 μl, DNA (100ng±) 加水至总体积 25 μl。

PCR 反应程序:95℃热启动 15 分钟后,进行 40 循环(95℃ 30 秒,60℃45 秒,72℃1 分钟),然后 72℃延伸 10 分钟。4℃保存。

Jurkat、U937、Raji 和 NALM 17 抽提的 DNA 作为甲基化或非甲基化阳性对照,其中一些细胞系的甲基化状态在其他研究中已经证实^[5]。

1.3.4 琼脂糖电泳 取 10μl PCR 反应产物直接加到 3%的琼脂糖凝胶进行电泳,用溴乙锭标记,并在紫外仪下显影观测。

1.3.5 RNA 抽提 经过肝素抗凝的外周血,经 Ficoll 液分离出单个核细胞,采用 QIAGEN RNA 抽提试剂盒 RNeasy Protect Mi-

ni Kit,按照试剂盒操作步骤抽提 RNA,并用分光光度仪测定 RNA 浓度。细胞株也用上述方法抽提 RNA。

1.3.6 cDNA 合成 采用 QIAGEN Sensiscript RT Kit 将 RNA 逆转录为 cDNA。

引物:Random Primer 5'-NNN NNN-3'

PCR 反应体系:10× buffer 2μl, 5mM dNTP 2μl, 50ng/μl Random Primer 1μl, 逆转录酶 1ul, 10μg/μl RNase inhibitor 1μl, RNA (40ng±) 加 RNA-free Water 至 20ul。

PCR 反应程序:37℃ 1 小时,93℃ 5 分钟,4℃保存。

1.3.7 Real-time PCR 采用 ABI PRISM 7900 sequence detection system(Applied Biosystems, ABI)进行 PCR 反应。

根据参考文献^[6]设计引物,并由英骏生物技术有限公司(Invitrogen Biotechnology Co. Ltd)合成。每条引物合成 5 OD。

SOCS-1 基因引物:

S(sense) 5'-AACTGCTTTTTCGCCCTTAGC

AS(antisense) 5'-CAGCTCGAAGAGGCAGTCG

内参照物 GAPDH 引物:

S(sense) 5'-GACCACAGTCCATGCCATCAC

AS(antisense) 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTA

PCR 反应体系:cDNA 0.5μl, 10μM primer 0.15μl, SYBR Green master mix 5μl(Applied Biosystems, ABI), RNA-Free water 4.35μl, 总反应体积为 10μl。

PCR 反应条件:首先 50℃ 2 分钟,95℃ 10 分钟热启动,然后进行 40 个循环(95℃ 15 秒,60℃ 60 秒)。

数据由 ABI PRISM 7900 进行收集及分析。GAPDH 基因作为内源性的参照,以标准化各个标本中 SOCS-1 基因相对表达量。所有的数值以相对于 GAPDH 基因升高或减少的倍数(Fold)表示。各个标本基因复制的数值以 cycle threshold(Ct)表达。基因表达的数量(Ct)以目的基因与内源性参照基因 GAPDH Ct 值的差值表示。而基因的相对表达量(Ct)以检测标本与参照标本 Ct 的差值表示。然后目的基因的相对表达量以 2^{-Ct}表示^[6]。

1.4 统计方法

采用 t 检验(统计软件 SPSS v11.5),P<0.05 为有差异,具有统计学意义。

2 结果

2.1 SOCS-1 基因甲基化水平 MSP 检测结果

4 例血液系统肿瘤细胞株 Raji (B 淋巴细胞系)、Jurkat(T 细胞系)、U937(粒细胞系)、NALM17(原始 B 细胞系)中, Jurkat 和 U937 表现为 SOCS-1 基因甲基化阳性, Raji 和 NALM17 为甲基化阴性,其甲基化率 50%。

本实验选择 2 株血液系统肿瘤细胞株作为参照物。其中 Jurkat 为阳性参照物, Raji 为阴性参照物,水为双阴性参照物。M 表示甲基化(Methylation), U 表示非甲基化(Unmethylation)。其中 Marker 为 Takara(DL2000),其最前面条带为 100bp,第二根为 250bp,后面四条分别为 500bp、750bp、1000bp、2000bp,每条带的量约为 50ng。根据先前设计的 SOCS-1 基因甲基化引物进行 PCR 扩增的产物,琼脂糖电泳条带出现于 160bp 位置,而

根据 SOCS-1 基因非甲基化引物进行 PCR 扩增的产物 ,琼脂糖电泳条带出现于 175bp 位置。Jurkat 细胞株于 M 电泳带出现 160bp 位置的条带 ,而 U 电泳带无条带出现 ,说明为甲基化阳性细胞株 ,Raji 细胞株于 U 电泳带出现 175bp 位置的条带 ,而 M 电泳带无条带出现 ,说明为甲基化阴性细胞株 ,水作为双阴性对照 ,M 和 U 电泳带均无条带出现。(见图 1)

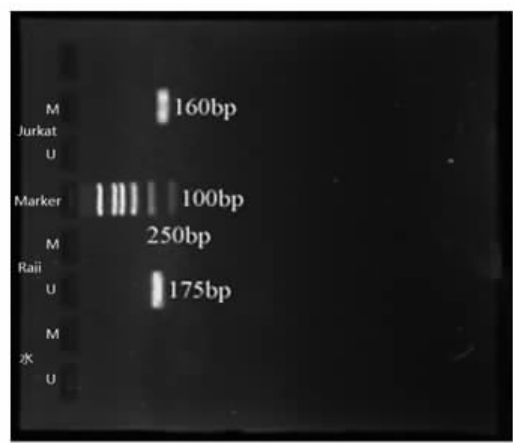


图 1 血液系统肿瘤细胞株(参照物)SOCS-1 基因甲基化电泳结果
Fig.1 The electrophoresis results of methylation of SOCS-1 gene of cell line in hematology malignance

在 24 例 AML 患者中 ,15 例存在 SOCS-1 基因 CpG 岛的异常甲基化(62.5%) ,其中 5 例为部分甲基化(20.8%) ,10 例完全甲基化(41.7%)。正常对照组均无 SOCS-1 基因的甲基化表现。二者有明显统计学差异(P<0.05)。部分 AML 患者琼脂糖电泳结果见图 2。

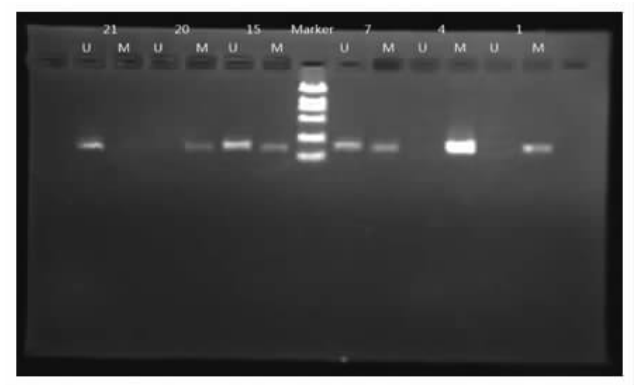


图 2 部分 AML 患者 SOCS-1 基因甲基化电泳结果
Fig.2 The electrophoresis results of methylation of SOCS-1 Gene in AML patients

其中第 1、4、20 例 AML 患者表现为 SOCS-1 基因完全甲基化 ,M 电泳带出现 160bp 位置的条带 ,而 U 电泳带无条带出现 ;第 7、15 例 AML 患者为 SOCS-1 基因部分甲基化 ,M 电泳带出现 160bp 位置的条带 ,U 电泳带也出现 175bp 位置的条带 ;第 21 例 AML 患者表现为 SOCS-1 基因非甲基化 ,U 电泳带出现 175bp 位置的条带 ,而 M 电泳带无条带出现。

2.2 SOCS-1 基因水平 Real-time PCR 检测结果

24 例 AML 患者组的 SOCS-1 基因表达量明显低于正常

对照组 (P<0.01) ,有显著差异 ;4 例血液系统肿瘤细胞株的 SOCS-1 基因表达量也显著低于正常对照组(P<0.01) ,同样有显著差异 (见图 3)。AML 组的 SOCS-1 基因表达量 (43.99± 29.50)明显低于正常对照组(203.48± 109.68)(P<0.01) ;4 例血液系统肿瘤细胞株的 SOCS-1 基因 Real-time PCR 检测中 ,显示 SOCS-1 基因表达量 (4.49± 4.60) 也显著低于正常对照组 (203.48± 109.68)(P<0.01) ,均有显著差异。

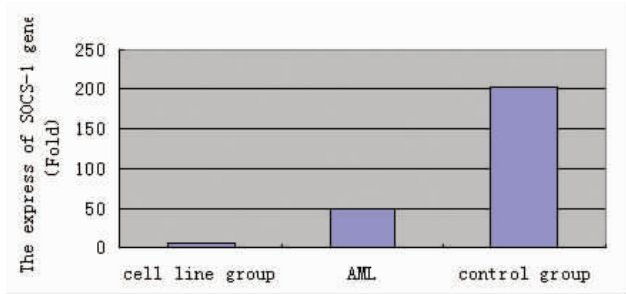


图 3 细胞株、AML 和对照组的 SOCS-1 基因表达量
Fig.3 The express of SOCS-1 gene in cell line, AML and control group

其中细胞株 Jurkat 和 U937 表现为 SOCS-1 基因甲基化阳性 ,Raji 和 NALM 17 表现为 SOCS-1 基因 甲基化阴性 ,前者 SOCS-1 基因表达水平(2.47± 0.90)也低于后者(12.61)(P<0.05)。24 例 AML 患者中 SOCS-1 基因甲基化组的 SOCS-1 基因表达水平低于非甲基化组(P<0.01) ,有统计学差异 (见图 4)。SOCS-1 基因甲基化组的 SOCS-1 基因表达水平(29.42± 17.45)低于非甲基化组(57.19± 34.70) (P<0.01) ,有统计学差异。

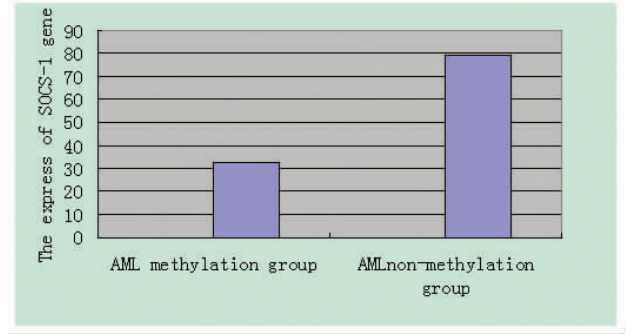


图 4 AML 中甲基化组和非甲基化组 SOCS-1 基因表达量
Fig.4 The express of SOCS-1 gene of methylation group and non-methylation group in AML patients

2.3 AML 患者临床特征

在 24 例 AML 患者中 ,15 例有 SOCS-1 基因甲基化 ,9 例无 SOCS-1 基因甲基化。甲基化组男性 9 例 ,女性 6 例 ,非甲基化组男性 5 例 ,女性 4 例 ;二组性别比较无统计学差异(P>0.05)。甲基化组年龄(70.89± 7.48) ,非甲基化组年龄(64.06± 9.18) ,二组年龄比无统计学差异(P>0.05)。甲基化组初发 11 例 ,复发 4 例 ,非甲基化组初发 7 例 ,复发 2 例 ,同样无统计学差异(P>0.05)。

3 讨论

白血病是一类造血干细胞的克隆性恶性疾病 ,其发病机理

和病因非常复杂,目前尚不完全清楚。未经治疗的急性白血病患者平均生存期仅3个月。目前随着科学技术和医疗水平的不断发展,成人白血病的完全缓解率、5年生存率都得到明显提高,甚至达到痊愈,但是其治愈率仍低于1/3,同时存在复发和治疗无明显疗效等情况。大部分患者仍然死于白血病及其引起的并发症^[7]。细胞因子信号转导抑制因子-1(SOCS-1)是上世纪90年代发现的能抑制细胞因子信号转导的蛋白,它与多种疾病的发生发展都有关系。人SOCS-1基因位于染色体的16p13.3,表达产物为221个氨基酸的蛋白质。SOCS-1通过作用于细胞因子信号转导通路(主要是JAK/STAT通路),负反馈调节细胞因子的信号转导^[8]。SOCS基因家族主要通过3种机制发挥作用,一是直接结合活化的JAK激酶而抑制其催化活性;二是直接结合到磷酸化的受体上,与信号分子竞争受体结合位点;三是通过SOCS盒与Elongin B、C复合物结合,破坏SOCS蛋白终止其抑制作用。在SOCS-1的N-末端,有一个作用类似于假性物质的激酶抑制区(KIR),能抑制JAK酪氨酸激酶的活性。SOCS-1通过其SH2结构域与JAK活化环直接结合,SOCS-1的KIR与JAK的催化单位结合,从而抑制其催化活性^[9]。多种细胞因子如IL-2、IL-4、IL-6、IL-13、IFN、TNF等均可诱导SOCS-1表达,而SOCS-1能抑制多种JAK激活的信号通路,从而负调控细胞因子的表达^[10,11]。如白血病抑制因子(LIF)、IL-6激活的STAT3通路、干扰素(IFN)和IL-6激活的STAT1通路、EPO激活的STAT5通路、IL-2激活的c-fos通路等,都能被SOCS-1所抑制^[12]。

DNA甲基化是在甲基转移酶介导下将胞嘧啶(C)加上一个甲基变为5-甲基胞嘧啶(5-mC)的一种反应,这种反应常发生在抑癌基因的启动子区,也可以延伸到基因的外显子区^[13]。许多研究表明基因启动子区CpG岛异常甲基化可以抑制相应基因的表达,而且与肿瘤发生密切相关^[14,15]。SOCS-1甲基化后,由于CpG岛高度甲基化导致其转录功能的失活,基因不能表达,使SOCS-1丧失JAK/STAT通路的抑制作用,转导信号的不断增强,从而支持肿瘤细胞的生存和不断增殖。2001年,Yoshikawa H等首先报道在肝细胞性肿瘤(HCC)中发现SOCS-1基因被高度甲基化而失活,而将未甲基化的SOCS-1转染到HCC细胞株,可以抑制其生长并促进其凋亡^[4]。随后,在胃肠道肿瘤^[16]、胰腺肿瘤^[17]、多发性骨髓瘤^[18]等疾病都相继有SOCS-1基因被高度甲基化的研究报道。目前正在以全基因组为范围的发现新致病基因的策略,因此,对白血病发展过程中的基因改变的研究可能有助于阐明白血病的病因及发病机理。

本研究结果显示,在AML中SOCS-1基因存在高度甲基化(62.5%),明显高于正常对照组(0%),有统计学差异($P<0.05$),而与患者的年龄、性别、疾病分期无关($P>0.05$)。同时,在AML患者中SOCS-1基因表达量明显低于正常对照组($P<0.01$);其中甲基化组的SOCS-1基因表达量同样低于非甲基化组($P<0.05$)。4株血液系统肿瘤细胞株(Raji、Jurkat、U937、NALM 17)的实验结果也与急性白血病结果基本一致,SOCS-1基因表达量明显低于正常对照组($P<0.01$);其中Jurkat和U937表现为SOCS-1基因甲基化,Raji和NALM 17表现为非甲基化,前者SOCS-1基因表达量明显低于后者。以上结果可以说明,SOCS-1基因在AML的病因及发病机理中可能具有

一定作用,SOCS-1基因甲基化后可以引起基因表达减少。因此,今后对SOCS-1基因做进一步研究是有意义的。随着对其及甲基化研究的深入,可能会找到一个新的治疗白血病甚至肿瘤的靶点。

参考文献(References)

- [1] Starr R, Willson T A, Viney E M, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling[J]. *Nature*, 1997, 387(6636):921-924
- [2] Cooney R N. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway[J]. *Shock*, 2002, 17(2):83-90
- [3] Wajed SA, Laird PW, DeMeester TR. DNA methylation: an alternative pathway to cancer[J]. *Ann Surg*, 2001,234(1):10-20
- [4] Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity [J]. *Nat Genet*, 2001, 28(1):29-35
- [5] Herman JG, Graff JR, Myohanen S. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(18):9821-9826
- [6] XU GW, Nie H, Li NL. Role of osteopontin in amplification and perpetuation of rheumatoid synovitis [J]. *Clin. Invest*, 2005,115: 1060-1067
- [7] Richard S, Margaret O'D, Mikkael S. Acute myeloid leukemia. Education Program Book of the ASH. California, 2004: December 4-7
- [8] Croker BA, Kiu H, Nicholson SE. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway[J]. *Semin. Cell Dev. Biol*, 2008,19:414-422
- [9] Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, et al. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop[J]. *EMBO J*, 1999, 18: 1309-1320
- [10] Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases [J]. *Nature*, 1997, 387(6636): 921-924
- [11] Naka T, Narazaki M, Hirata M. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor[J]. *Nature*,1997, 387(6636):924-929
- [12] Starr R, Metcalf D, Elefanty AG, et al. Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998,95(24):14395-14399
- [13] Herman JG. Hypermethylation of tumor suppressor genes In cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 1999,9: 359-367
- [14] Herman JG, Latif F, Weng Y. Silencing of the VHL Tumor-Suppressor Gene by DNA Methylation in Renal Carcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1994,91: 9700-9704
- [15] Herman JG, Merlo A, Mao L. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers[J]. *Cancer Res*,1995,55: 4525-4530
- [16] To KF, Chan MW, Leung WK, et al. Constitutional activation of IL-6-mediated JAK/STAT pathway through hypermethylation of SOCS-1 in human gastric cancer cell line[J]. *Br J Cancer*,2004,91(7): 1335-1341
- [17] Fukushima N, Sato N, Sahin F. Aberrant methylation of suppressor of cytokine signaling-1 gene in pancreatic ductal neoplasms [J]. *British journal of cancer*,2003,89:338-343
- [18] Galm O, Yoshikawa H, Esteller M. SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma[J]. *Blood*,2003,101(7):2784-2788