

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.08.021

白血病患者骨髓中 RASSF1A 基因启动子甲基化状态及其临床意义

周向成¹ 李佐青^{1△} 苏丹² 王波¹ 王佳¹

(1 上海交通大学医学院病理生理学教研室 上海 200025; 2 上海儿童医学中心儿童血液肿瘤科 上海 200025)

摘要 目的:通过检测各类型白血病骨髓中 RASSF1A 基因启动子区甲基化水平,探讨其对白血病分型的临床检测意义。**方法:**抽选 93 例不同类型白血病患者(观察组)予以甲基化特异性 PCP(MSP)方法进行骨髓 RASSF1A 基因甲基化状态检测,研究不同类型白血病甲基化状态差异,同期抽选 93 例非白血病患者为对照研究(对照组)。**结果:**观察组中有 13 例(13.98%)检测到 RASSF1A 基因甲基化,而对照组中 RASSF1A 基因甲基化率为 0%,比较差异显著($P<0.05$)。不同类型白血病 RASSF1A 甲基化率比较:淋巴系显著高于髓系($P<0.05$),急性与慢性白血病比较差异无显著性($P>0.05$)。**结论:**白血病骨髓中 MSP 法检测存在 RASSF1A 甲基化;而 RASSF1A 基因在淋巴系白血病中的甲基化概率明显增高,因此,对 RASSF1A 进行甲基化检测有可能作为白血病临床诊断分型的生物学指标之一。

关键词:甲基化;RASSF1A;诊断分型;白血病

中图分类号:R733.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)08-1479-03

The Status of RASSF1A Gene Promoter Methylation in Bone Marrow of Patients with Leukemia and the Clinical Significance

ZHOU Xiang-cheng¹, LI Zuo-qing^{1△}, SU Dan², WANG Bo¹, WANG Jia¹

(1 Department of pathophysiology, School of Medicine of Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200025, China; 2 Department of children with hematological tumor, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: To investigate status of RASSF1A gene promoter methylation in bone marrow of patients with leukemia and the clinical significance. **Methods:** The selected 93 patients with different types of leukemia patients (observation group) by methylation specific PCP (MSP) method was taking for detection of methylation status of RASSF1A gene in bone marrow, Differences between patients with different types of leukemia state methyl, Over the same period 93 patients with non leukemia were selected as control study (the control group). **Results:** The observation group had 13 cases (13.98%) for detecting the methylation of RASSF1A gene, while in the control group, RASSF1A gene methylation rate was 0%, there was significant difference($P<0.05$). Different types of leukemia RASSF1A methylation rate was significantly higher than that of comparison: lymphoid myeloid($P<0.05$), acute and chronic leukemia had no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion:** Detection of MSP by leukemic bone marrow in RASSF1A methylation; methylation probability RASSF1A gene in lymphocytic leukemia is obviously increased, therefore, the detection of RASSF1A methylation may be one of the biological index for clinical diagnosis of leukemia subtypes.

Key words: Methylation; RASSF1A; Diagnosis; Leukemia

Chinese Library Classification(CLC): R733.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)08-1479-03

前言

白血病是具有克隆性质的一类恶性造血干细胞疾病,其发病机制及病因均极为复杂,到目前为止,临床研究尚未完全明确^[1,2]。据报道统计未经治疗的急性白血病生存期不超过 3 个月,随着近年来医疗技术的发展,成人白血病患者临床治疗完全缓解率以及 5 年远期生存率均有明显提高,甚至可以恢复痊愈,但其治愈率仅及 1/3,仍存在治疗效果不显著及复发危险等

情况,大部分病人仍死于白血病及其并发症中^[3,4]。RASSF1A 基因是在 2000 年发现的一种新型抑癌基因,其甲基化状态和多种肿瘤疾病相关,但其与白血病的关系及其在白血病病理机制中的作用还不清楚^[5,6]。本研究抽选 93 例不同类型白血病患者为观察研究,通过检测各类型白血病骨髓中 RASSF1A 基因启动子区甲基化水平,探讨其在白血病发病中起到的可能机制,为今后临床治疗提供一个考虑新方向,现报道如下。

1 资料和方法

1.1 临床资料

抽选我院 2012 年 3 月 -2013 年 7 月 93 例白血病患者骨髓,均经病理细胞学检测确诊,其中男 46 例,女 47 例,年龄 23-82 岁,急、慢性髓系白血病(AML、CML)各 26 例,急、慢性淋巴系白血病(ALL、CLL)分别为 21、20 例。同期抽选 93 例非

作者简介:周向成(1989-),男,硕士研究生,从事病理生理学方向研究,E-mail:zhouxiangcheng1989@163.com

△通讯作者:李佐青(1976-),男,博士,讲师,主从事分子生物学、病理生理学方面的研究

(收稿日期:2013-09-17 接受日期:2013-10-10)

白血病患者骨髓为对照研究(对照组),均为因贫血、发热等原因待查,予以骨髓穿刺病理学检测排除白血病诊断,其中男 45 例,女 48 例,年龄 23-81 岁。

1.2 主要试剂

QIAamp DNA kit 提取试剂盒是从美国 QIAGEN 采购;EZ DNA 甲基化修饰试剂盒是从美国 ZYMO RESEARCH 公司选购;引物由上海博尚公司合成;荧光定量 PCR 仪是由美国 BIO-RAD 公司生产,型号为 CFX96;购自美国贝克曼 DU730 核酸检测仪。

1.3 检测方法

1.3.1 骨髓单个核 cell 分离 从每例患者中骨髓穿刺抽取 10 mL 骨髓血,予以 3.8% 的柠檬酸钠抗凝,再予以 Ficoll 液进行单个核 cell 分选(MNCs)。

1.3.2 DNA 提取 采用 QIAamp DNA kit 提取试剂盒抽提总 RNA,采用贝克曼 DU730 测定已提取核酸的纯度,在 -80℃ 温度下储存备用。

1.3.3 MS-PCR 方法检测骨髓 RASSF1A 基因甲基化 严格按照 EZ DNA 试剂盒上面的说明书进行 DNA 修饰,修饰后的 DNA 予以 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μ L,95℃ 预变性 10 分钟,94℃ 变性 30 秒,65℃ 退火 1 分钟,72℃ 延伸 45 秒,重复

循环 40 次,最后一次循环 72℃ 延伸至 10 分钟。引物序列:甲基化引物:反义为 5'-GCTAACAAACGCGAACCG-3' 以及反义 5'-GGGTTTTGCGAGAGCGCG-3';非甲基化引物:反义为 5'-CACTAACAAACACAAACCAAAC-3' 以及正义为 5'-GGTTTTGTGAGAGTGTGTTTAG-3'。扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶进行 40 分钟的电泳成像后进行结果观察。以多次检验均非甲基化的 RPMI8226 以及多次检验均甲基化的 U266 细胞株为阴性和阳性对照。

1.4 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量资料以 n% 表示,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白血病患者和非白血病患者 RASSF1A 甲基化检测结果

观察组中有 13 例 (13.98%) 检测到 RASSF1A 基因甲基化,而对照组中 RASSF1A 基因甲基化率为 0%,比较差异显著 ($P < 0.05$),详见表 1。

2.2 不同类型白血病 RASSF1A 甲基化率比较

淋巴系白血病 RASSF1A 甲基化率显著高于髓系 ($P < 0.05$),急性与慢性白血病比较差异无显著性 ($P > 0.05$),详见表 2。

表 1 两组 RASSF1A 甲基化检测结果[n(%)]

Table 1 Detection results of RASSF1A methylation between two groups [n(%)]

项目 Projects	例数 Cases	甲基化 Methylation	非甲基化 NO methylation	X^2	P
观察组 Observation group	93	13 (13.98)	80 (86.02)	11.9093	0.0006
对照组 Control group	93	0 (0)	93 (100)		

表 2 不同类型白血病 RASSF1A 甲基化率比较[n(%)]

Table 2 Comparison of RASSF1A methylation rate in different types of leukemia[n(%)]

项目 Projects	例数 Cases	甲基化 Methylation	非甲基化 NO methylation	X^2	P
髓系白血病 Myeloid leukemia	52	2 (3.85)	50 (96.15)	8.2449	0.0041
AML	26	1	25		
CML	26	1	25		
淋巴系白血病 Lymphoid leukemia	41	11 (26.83)	30 (73.17)	0.0017	0.9667
ALL	21	6	15		
CLL	20	5	15		
急性白血病 Acute leukemia	47	7 (14.89)	40 (85.11)	0.0017	0.9667
慢性白血病 Chronic leukemia	46	6 (13.04)	40 (86.96)		

3 讨论

目前研究发现在结直肠癌、肝癌、胃癌等多种实体肿瘤中存在 DNA 基因启动子区 CpG 岛甲基化。DNA 甲基化是一种可逆性病理改变,逆转 CpG 岛异常甲基化可重新表达沉默基因^[7-9]。近年来越来越多恶性血液性疾病经研究证实存在 DNA 甲基化状态,抑癌基因高甲基化表达检测对恶性血液性疾病的临床诊断以及评估治疗预后具有重要意义,已经成为血液性疾

病领域的研究新热点^[10,11]。

科学家在 2000 年对分子量为 39kDa 的 RASSF1A——属于新型抑癌基因进行了报道,其可对 340 个氨基酸残基予以编码,是从单独 CpG 岛启动子区转录,包含 8 个外显子,可以产生 7 个转录物^[12,13]。大量研究发现,在 RASSF1A 区域上发生的基因缺失是频繁出现的“二次打击”,而发生于该区的基因突变则是一种偶然事件^[14,15]。调查研究发现 RASSF1A 本质是一种多功能蛋白,能够调控凋亡过程中以及有丝分裂时的微管动力

学。RASSF1A 重新表达对肺癌、前列腺癌、乳腺癌、鼻咽癌以及神经胶质瘤等癌症细胞生长具有抑制作用,无论是体外实验还是活体系统中均起效。RASSF1A 异常表达阻断细胞周期从而显著改变基因表达,包括 cyclinD 等 cell 周期调控基因以及具有转录功能、血管生成、细胞粘附迁移凋亡以及信号传递等功能的多种基因。RASSF1A 调控细胞凋亡至少有两种路径,首先它对 MST1 具有抑制作用。因此 RASSF1A 与 MST1 复合物可以用于充当“感觉模块”,对经 Ras 通路所产生的预凋亡信号进行检测。RASSF1A 和其他直接结合 Ras 的蛋白有所不同,其是间接和 K-RAS 相联合的。RASSF1A 与 MST1 复合物也可间接与 Ras 结合。另外,RASSF1A 还通过与 MOAP-1 结合控制凋亡。RASSF1A 还能够和 Ras-GTP 结合从而介导产生 MEK-ERK 信号通路,阴气多种生物学效应,比如对细胞生长、分化以及凋亡的调控等^[16,17]。

RASSF1A 基因甲基化作为一种和肿瘤疾病发生发展相关的热点基因,与血液性疾病的关系近年来亦逐渐受到临床研究的关注和重视。Valencia 等^[18]发现大约有 15%的急性白血病患者中存在 RASSF1A 甲基化;Johan 等^[19]研究发现在 MDS 和 AML 中存在较低的 RASSF1A 基因甲基化率。Avramouli 等^[20]虽然在 CML 中未检测出 RASSF1A 甲基化,但在 K562 细胞株中检测到有 RASSF1A 甲基化的存在。本研究结果显示,观察组中有 13 例(13.98%)检测到 RASSF1A 基因甲基化,而对照组中 RASSF1A 基因甲基化率为 0%,比较差异显著($P < 0.05$)。由此可推测白血骨髓中 MSP 法检测存在 RASSF1A 甲基化。并且本研究还发现不同类型白血病患者 RASSF1A 甲基化率比较:淋巴系显著高于髓系($P < 0.05$),而在急性与慢性白血病比较差异无显著性($P > 0.05$)。综上所述说明,对 RASSF1A 进行甲基化检测有可能作为白血病临床诊断分型的生物学指标之一。

参考文献(References)

- [1] Dennis M, Culligan D, Karamitros D, et al. Lenalidomide monotherapy and in combination with cytarabine, daunorubicin and etoposide for high-risk myelodysplasia and acute myeloid leukaemia with chromosome 5 abnormalities[J]. Leuk Res Rep, 2013, 2(2): 70-74
- [2] Santos FP, Kantarjian H, Garcia-Manero G, et al. Decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2010, 10(1): 9-22
- [3] 庄衍,程毅敏,汪雷等.成人急性髓性白血病 SOCS-1 基因及其甲基化的研究[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(18): 3417-3420
Zhuang Yan, Cheng Yi-min, Wang Lei, et al. The Methylation of SOCS-1 Gene in Adult Acute Myeloid Leukemia [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(18): 3417-3420
- [4] Fenaux P, Mufti G J, Hellstrom-Lindberg E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study[J]. The lancet oncology, 2009, 10(3): 223-232
- [5] Steensma D P, Baer M R, Slack J L, et al. Multicenter study of decitabine administered daily for 5 days every 4 weeks to adults with myelodysplastic syndromes: the alternative dosing for outpatient treatment (ADOPT) trial [J]. Journal of Clinical Oncology, 2009, 27(23): 3842-3848
- [6] Yang X, Lay F, Han H, et al. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy[J]. Trends Pharmacol Sci, 2010, 11(31): 536-546
- [7] Nordlund J, Backlin CL, Wahlberg P, et al. Genome-wide signatures of differential DNA methylation in pediatric acute lymphoblastic leukemia[J]. Genome Biol, 2013, 14(9): r105
- [8] Li ZG, Jiao Y, Li WJ, et al. Hypermethylation of two CpG sites upstream of CASP8AP2 promoter influences gene expression and treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Leuk Res, 2013, 37(10): 1287-1293
- [9] Jia JS, Salvatore S. Methylation of CpG island in promoter region of RUNX2 gene and its expression in HOX11 (+) acute T lymphoblastic leukemia [J]. Journal of Experimental Hematology, 2013, 21 (2): 273-278
- [10] Whittle AM, Feyler S, Bowen DT. Durable second complete remissions with oral melphalan in hypocellular Acute Myeloid Leukemia and Refractory Anemia with Excess Blast with normal karyotype relapsing after intensive chemotherapy [J]. Leuk Res Rep, 2013, 2(1): 9-11
- [11] Sharma SK, Choudhary D, Handoo A, et al. Gelatinous transformation of bone marrow following the use of dasatinib in a patient with philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia[J]. Leuk Res Rep, 2013, 2(1): 7-8
- [12] Yu MY, Tong JH, Chan PK, et al. Hypermethylation of the tumor suppressor gene RASSF1A and frequent concomitant loss of heterozygosity at 3p21 in cervical cancers [J]. Int J Cancer, 2003, 105(2): 204-209
- [13] Nakane Y, Natsume A, Wakabayashi T, et al. Malignant transformation-related genes in meningiomas: allelic loss on 1p36 and methylation status of p73 and RASSF1A [J]. J Neurosurg, 2007, 107(2): 398-404
- [14] Pronina IV, Loginov VI, Khodyrev DS, et al. Alterations of expression level of RASSF1A gene in primary epithelial tumors of various locations[J]. Mol Biol (Mosk), 2012, 46(2): 260-268
- [15] Johan MF, Bowen DT, Frew ME, et al. Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia[J]. Br J Haematol, 2005, 129(1): 60-65
- [16] Claus R, Hackanson B, Poetsch A R, et al. Quantitative analyses of DAPK1 methylation in AML and MDS[J]. Int J Cancer, 2012, 131(2): 138-142
- [17] Deneberg S. Epigenetics in myeloid malignancies [J]. Methods Mol Biol, 2012, 863: 119-137
- [18] Valencia A, Cervera J, Such E, et al. Aberrant methylation of tumor suppressor genes in patients with refractory anemia with ring sideroblasts[J]. Leuk Res, 2011, 35(4): 479-483
- [19] Johan MF, Bowen DT, Frew ME, et al. Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia[J]. Br J Haematol, 2010, 129(1): 60-65
- [20] Avramouli A, Tsochas S, Mandala E, et al. Methylation status of RASSF1A in patients with chronic; myeloid leukemia [J]. Leuk Res, 2009, 33(8): 1130-1132