

• 论 著 •

25 例白血病患者 TES 基因启动子区甲基化状态的研究

白 宇, 邱艳辉, 王新华[△]
(航天中心医院输血科, 北京 100069)

摘 要:目的 研究白血病患者骨髓中 Testin 蛋白 (TES) 基因启动子区甲基化状态, 探讨 TES 基因与白血病的关系。方法 以 13 例原发性急性髓系白血病和 12 例急性淋巴系白血病患者的骨髓标本为研究对象, 以 15 例健康者骨髓标本作对照, 采用焦磷酸甲基化测序 (BSP) 方法检测骨髓中 TES 基因启动子的甲基化水平, 分析健康者与白血病患者之间甲基化状态, 以及不同类型白血病之间 TES 基因启动子区甲基化状态是否存在差异。结果 25 例白血病患者骨髓标本中共有 21 例 TES 基因启动子区高甲基化, 阳性率为 84.0%。15 例健康者骨髓标本均未检测到 TES 基因启动子区甲基化。12 例急性淋巴系白血病患者骨髓标本中 TES 基因启动子区甲基化率为 83.3%; 13 例原发性急性髓系白血病患者骨髓标本中 TES 基因启动子区甲基化率为 84.6%, 二者差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 TES 基因启动子区甲基化检测可能成为白血病诊断的生物标志物之一。

关键词: 白血病; TES 基因; 甲基化; 生物标志
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.19.024 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2017)19-2723-03

Methylation status of TES gene promoter region in 25 patients with leukemia

BAI Yu, DI Yanhui, WANG Xinhua[△]

(Department of Blood Transfusion, Aerospace Center Hospital, Beijing 100069, China)

Abstract: **Objective** To study the methylation status of Testin protein (TES) promoter region in bone marrow of leukemia patients, and to explore the relationship between TES gene and leukemia. **Methods** The bone marrow specimens of 13 patients with primary acute myeloid leukemia and 12 patients with acute myeloid leukemia were studied. Bone marrow samples from 15 healthy subjects were used as controls, the methylation level of TES gene promoter in bone marrow was detected by BSP, the methylation status between healthy subjects and leukemia patients, and whether there was any difference in methylation status between different types of leukemia were analyzed. **Results** In 25 cases of leukemia, there were 21 cases of bone marrow samples, and the hypermethylation of TES gene promoter region was positive, with a positive rate of 84.0%. The methylation of the gene was not detected in bone marrow samples from 15 healthy subjects. The methylation rate of TES gene in bone marrow samples of 12 patients with acute lymphoblastic leukemia was 83.3%, the methylation rate of TES gene in bone marrow samples of 13 patients with primary acute myeloid leukemia was 84.6%, and there was no significant difference between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** Methylation of TES gene might be one of the biomarkers in the diagnosis of leukemia.

Key words: leukemia; TES gene; methylation; biomarker

白血病是一类造血干细胞恶性克隆性疾病, 是我国最常见的恶性肿瘤之一。各地区白血病的发病率在各种肿瘤中占第 6 位, 其发病的分子机制非常复杂。从遗传学角度看, 有研究发现, 白血病中 DNMT3A 基因突变可能与白血病的发生和发展相关^[1-5]。从表观遗传学角度看, 与其他一些常见的恶性肿瘤相似, 基因启动子区甲基化异常在白血病中非常普遍。有研究报道, 白血病患者存在 RASSF1A、RUNX3 等基因 DNA 甲基化的改变^[6-8]。Testin 蛋白 (TES) 基因是一种抑癌基因, 在不同种类肿瘤中被发现启动子区甲基化, 但其在白血病中的甲基化状态和关系尚不清楚。本研究用焦磷酸甲基化测序 (BSP) 方法分别对 25 例白血病患者骨髓标本和 15 例健康者骨髓标本的 TES 基因启动子区甲基化程度进行检测, 并且对不同类型白血病的甲基化状态进行比较, 探讨 TES 基因启动子区甲基化与白血病发生的关系。

1 材料与方法

1.1 标本收集 收集 25 例经骨髓细胞学检查确诊的白血病患者骨髓标本, 白血病患者中原发性急性髓系白血病 13 例, 急性淋巴系白血病 12 例。同时, 收集 15 例因贫血或发热原因待

查, 经骨髓穿刺病理细胞学确诊为非白血病健康者作为对照组。所有白血病患者以及健康者骨髓标本均来自航天中心医院血液科实验室, 肿瘤分级按照“造血与淋巴组织肿瘤 WHO 2007 年分型标准”划分, 均为原发病例, 所有病例均未进行放化疗。标本在获得后用于提取 RNA、DNA, 并于 -80℃ 保存。

1.2 仪器与试剂 QIAamp DNA 试剂盒购自美国 QIAGEN 公司; DL2000、DNAMarker、Marker IV、随机引物均购自天根生化科技有限公司; dNTP、primer star GLX 均购自 TAKARA 生物技术有限公司; 甲基化修饰试剂盒购自 ZYMO RESEARCH 公司; 反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒购自 TaKaRa 公司; 引物由上海生工公司合成; 核酸检测仪为 Nano-Drop ND-1000 紫外分光光度仪。

1.3 引物设计 参考预测的 CpG 岛目的区域, 根据引物设计原则设计引物, 序列如下, 上游引物 M-TES-F1: GGA GAT TAG GTT AGG GTT ATT GAG TTT, 下游引物 M-TES-R1: CCC CCT ACC TTC TTC ACT TTA TTT, 片段大小为 397 bp。

1.4 总 RNA 提取 应用 Trizol 试剂从骨髓标本中提取总

RNA。每使用 1 mL Trizol 加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温放置 3 min。4 ℃ 10 000×g 离心 15 min,把水相转移到新管中,用异丙醇沉淀水相中的 RNA,每使用 1 mL Trizol 加入 0.5 mL 异丙醇,室温放置 10 min。4 ℃ 10 000×g 离心 10 min,移去上清,75%乙醇洗涤 RNA 沉淀,每使用 1 mL Trizol 至少加 1 mL 75%乙醇。4 ℃ 5 000×g 离心 5 min,弃上清,室温放置干燥 RNA 沉淀,所获 RNA 用于 RT-PCR 检测或-80 ℃保存。骨髓标本总 RNA 提取使用 Quigen 公司的 RNA 抽提试剂盒,提取步骤按照试剂盒说明书进行。

1.5 RT-PCR 反应 RT-PCR 使用 M-MLV 反转录酶,随机引物扩增第一条链 cDNA。所得 cDNA 进行下一步 PCR 反应。PCR 反应体系均为 25 μL,5×PBS 缓冲液 5 μL,dNTPs 2 μL,上下游引物各 0.5 μL,引物 STAR GLX 0.25 μL,DNA 模版 2 μL,灭菌双蒸水补足反应体积至 25 μL。扩增条件为:95 ℃ 预变性 3 min;98 ℃ 10 s,59 ℃ 15 s,72 ℃ 2.5 min,共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min。浓度不低于 50 ng/μL,总量不低于 1 μg。利用 2%凝胶电泳方法检测 DNA 质量,条带完整的进入下一步研究;应用 NanoDrop ND-1000 紫外分光光度仪检测 DNA 浓度与质量,然后将总 DNA 样品储存于-80 ℃。

1.6 基因组 DNA 的重亚硫酸盐处理和纯化 甲基化处理体系为 DNA 1 000 ng,DNA 保护缓冲液 35 μL,亚硫酸氢钠溶液 85 μL,RNase 自由水补足到 140 μL,条件为:95 ℃ 5 min;60 ℃ 15 s,95 ℃ 5 min,60 ℃ 15 min,30 ℃ 10 min。之后进行纯化,处理后液体直接转入 1.5 mL EP 管中,加入 310 μL 的 BL 液,再加入 250 μL 的无水乙醇,震荡 15 s 混匀,转入吸附柱,静置 5 min,13 000×g 离心 1 min,加入 500 μL BW 液,13 000×g 离心 1 min,弃废液,加入 500 μL BD 液,室温静置 15 min,13 000×g 离心 1 min,弃废液,加入 500 μL BW 液,13 000×g 离心 1 min,弃废液。加入 250 μL 无水乙醇,13 000×g 离心 1 min,弃废液。换新收集管,13 000×g 离心 2 min。将吸附柱放入 1.5 mL EP 管中,开盖,60 ℃ 干浴 5 min。在吸附柱膜上悬空滴加 15 μL EB,静置 5 min,13 000×g 离心 2 min 收集 DNA。处理后 DNA 于-20 ℃保存。

1.7 甲基化检测 以区域特异性引物进行 PCR 扩增,电泳后切胶回收后,将 PCR 纯化产物连接到 pGM-T 进行 TA 克隆,鉴定阳性克隆后提取质粒进行质粒测序,测序检测 TES 基因启动子区甲基化状态(上海英拜生物科技有限公司)。

1.8 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析,计量资料比较采用两样本 *t* 检验,计数资料以率表示,采用 χ^2 检验进行比较,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TES 基因启动子区甲基化状态 对 25 例白血病患者骨髓标本,以及 15 例健康者骨髓标本进行 BSP 分析。结果显示,在 15 例健康者骨髓标本中均未检测到 TES 基因启动子区甲基化,见图 1。25 例白血病患者骨髓标本中 TES 基因启动子区甲基化位点呈普遍高甲基化,见图 2。TES 启动子区共有 48 个 CpG 位点。对照组和白血病区 TES 基因启动子区甲基化状态进行比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。健康者骨髓标本和白血病患者骨髓标本 TES 基因启动子区甲基化状态比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。

2.2 原发急性髓系白血病和急性淋巴系白血病 TES 基因启动子区甲基化状态 对白血病的不同类型之间甲基化状态进行比较显示,在所有 12 例急性淋巴系白血病患者骨髓中有 10

例发现高甲基化,TES 基因启动子区甲基化率为 83.3%,在所有 13 例原发急性髓系白血病患者骨髓中有 12 例发现高甲基化,TES 基因启动子区甲基化率为 84.6%,组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

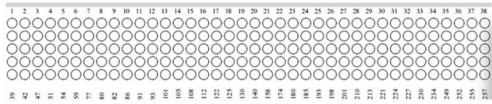


图 1 健康者 TES 基因启动子区甲基化状态

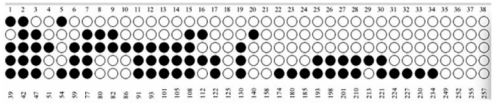


图 2 白血病患者 TES 基因启动子区甲基化状态

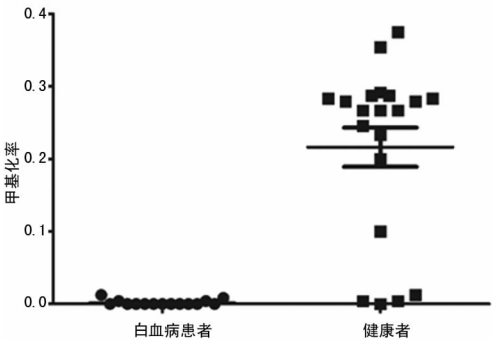


图 3 白血病骨髓与健康者骨髓 TES 基因启动子区甲基化状态的比较

3 讨 论

近年来,白血病的发病率不断上升。以往研究发现,肿瘤的发病机制有两方面因素,即遗传学和表观遗传学机制,肿瘤的遗传学路径表现为抑癌基因或癌基因的突变导致基因功能缺失或增加以及表达异常,如基因点突变,染色体易位,基因扩增/缺失等;而癌症的表观遗传学路径是由染色体组成成分的改变决定的,包括 DNA 甲基化,组蛋白的修饰和变异,核小体重构以及小的非编码调控 RNA 干扰等^[2-4]。在肿瘤的发生过程中,基因组 DNA 甲基化状态的改变会造成机体染色体不稳定或基因表达异常,最终导致肿瘤发生。DNA 甲基化是由 DNA 甲基化酶在胞嘧啶 5 位碳原子上转移甲基的过程,DNA 分子上 CpG 双核苷中的胞嘧啶处于甲基化状态。正常组织基因组 70% CpG 岛被甲基化,是基因组的一种基本修饰^[2]。目前为止,在肿瘤抑制基因启动子区的甲基化,包括其导致的基因沉默,被认为是肿瘤抑制基因失活的一种机制^[4]。在基因上游调控区的启动子区富含 CpG 二核苷酸的 CpG 岛,正常细胞与组织中 CpG 岛多处于非甲基化状态,而在肿瘤细胞或组织中,CpG 岛多处于高甲基化状态^[7]。目前,DNMT3A 被发现约 20% 的急性髓系白血病肿瘤发生多位点的突变^[7],在急性髓系白血病中发现 BCL2L10 基因启动子区高甲基化导致该基因失活,凋亡作用消失,在慢性髓系白血病中,75% 患者的 p15 基因 CpG 高甲基化,50%~86% 急性髓系白血病中存在 p15 基因 CpG 高甲基化,和患者预后呈负相关^[8-9]。也有报道发现,白血病中 LRP15、RASSF1A、RUNX3 基因启动子区高甲基化^[6,10]。

TES 基因位于 7 号染色体长臂 31.2 区段(7p31.2)易碎染色体 FRA7G 区域。TES 基因是由 C 端的 LIM 结构域和一个尚不明确功能的 PET 结构域组成的高度保守序列,其中第 3

组 LIM 结构域包含 TES 蛋白结构域,它具有局部黏附复合体,并与细胞外基质黏附和细胞间相互作用有关^[11-12], TES 基因也是一种抑癌基因,有研究发现, TES 基因可以促进细胞凋亡,在多种类型的肿瘤中存在 TES 表达的沉默,在不同种类肿瘤中该基因可通过杂合性缺失 (LOH) 以及启动子区甲基化而被沉默,如头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC)、脑胶质瘤、卵巢癌、原发性胃癌、前列腺癌、乳腺癌等^[11-16]。国外有研究报道,在儿童急性白血病中存在 TES 基因启动子区甲基化^[15,17],但国内尚无白血病中 TES 基因启动子区甲基化的研究报道。本研究对白血病患者骨髓标本与健康者骨髓标本进行了 TES 基因启动子区甲基化检测,以期找出 TES 基因启动子区甲基化与白血病发病的相关性。

随着微芯片技术以及数控方法的发展,人们对肿瘤中由于高甲基化导致基因沉默,以及对已知的基因进行生物学和临床等级相关的分类的认识正在逐渐加深。胞嘧啶甲基化模式的改变是组织和肿瘤特异性的,并且可以通过敏感的 PCR 方法稳定地检测到,为癌症的检测和诊断以及预后信息提供了可能^[7,13-14]。CpG 岛甲基化发生在致癌过程的早期,等位基因启动子区甲基化可以被检测并具有很高的灵敏度,现在对甲基化的检测被大量用以作为潜在的癌症早期检测系统^[3]。甲基化研究可用于抑癌基因的筛选、微小残留病灶的检测及预后判断。DNA 甲基化异常在白血病的发生发展中也起重要作用,本研究通过 BSP 法对 25 例白血病患者和 15 例健康者骨髓中 TES 基因启动子区甲基化状态的检测,结果发现,在 25 例白血病骨髓标本中,有 21 例存在 TES 基因启动子区甲基化 (84.0%)。研究还发现,急性淋巴系白血病 TES 基因启动子区甲基化率 (83.3%) 与原发急性髓系白血病 (84.6%) TES 基因启动子区甲基化率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这些研究结果表明,白血病患者骨髓中存在 TES 基因启动子区高甲基化,急性淋巴系白血病 TES 基因启动子区甲基化率与原发急性髓系白血病 TES 基因启动子区甲基化无差异。由于本研究标本量有限,有关 TES 基因启动子 CpG 岛甲基化与白血病类型的关系尚需进一步研究。TES 基因作为一种抑癌基因,高甲基化会导致其抑癌基因活性消失。白血病骨髓标本中 TES 基因启动子区高甲基化,可能导致白血病细胞凋亡失控,细胞迁移受限,从而进一步引发白血病的发生。由此推测,白血病中存在 TES 基因启动子区高甲基化,对 TES 基因启动子区甲基化的检测可能成为白血病的生物标志物之一。

参考文献

- [1] Jabbour E, Branford S, Saglio G, et al. Practical advice for determining the role of BCR-ABL mutations in guiding tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic myeloid leukemia[J]. *Cancer*, 2011, 117(9): 1800-1811.
- [2] Choe G, Horvath S, Cloughesy TF, et al. Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo[J]. *Cancer Res* 2003, 63(11): 2742-2746.
- [3] Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer[J]. *Carcinogenesis* 2010, 31(1): 27-36.
- [4] Dunwell T, Hesson L, Rauch TA, et al. A genome-wide screen identifies frequently methylated genes in haemato-

- logical and epithelial cancers[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 44.
- [5] Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia[J]. *N Engl J Med* 2010, 363(25): 2424-2433.
- [6] Bansal P, Ghalaut VS, Sharma TK, et al. Status of leptin in BCR-ABL p210 positive chronic myeloid leukemia patients before and after imatinib therapy: a conflicting scenario[J]. *Clin Lab*, 2014, 60(11): 1845-1852.
- [7] Kurkjian C, Kummar S, Murgu AJ. DNA methylation: its role in cancer development and therapy[J]. *Curr Probl Cancer*, 2008, 32(5): 187-235.
- [8] Avranlouli A, Tsochas S, Mandala E, et al. Methylation status of RASSF1A in patients with chronic myeloid [J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 105(3): 662-666.
- [9] Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH. The RASSF proteins in cancer: from epigenetic silencing to functional characterization [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2): 114-128.
- [10] 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 leukemia[J]. *Br J Haematol*, 2005, 129(1): 60-65.
- [11] Ma H, Weng D, Chen Y, et al. Extensive analysis of D7S486 in primary gastric cancer supports TESTIN as a candidate tumor suppressor gene[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 190.
- [12] Mueller W, Nutt CL, Ehrich M, et al. Downregulation of RUNX3 and TES by hypermethylation in glioblastoma [J]. *Oncogene*, 2013, 26(4): 583-593.
- [13] Le Gallo M, O'Hara AJ, Rudd ML, et al. Exome sequencing of serous endometrial tumors identifies recurrent somatic mutations in chromatin-remodeling and ubiquitin ligase complex genes[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(14): 1310-1315.
- [14] Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, et al. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(2): 480-491.
- [15] Weeks RJ, Kees UR, Song S, et al. Silencing of TESTIN by dense biallelic promoter methylation is the most common molecular event in childhood acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 163.
- [16] Zhang W, Yan W, You G, et al. Genome-wide DNA methylation profiling identifies ALDH1A3 promoter methylation as a prognostic predictor in G-CIMP- primary glioblastoma[J]. *Cancer Lett*, 2013, 328(1): 120-125.
- [17] Dittmann LM, Danner A, Gronych J, et al. Downregulation of PRDX1 by promoter hypermethylation is frequent in 1p/19q-deleted oligodendroglial tumours and increases radio- and chemosensitivity of Hs683 glioma cells in vitro [J]. *Oncogene*, 2012, 31(29): 3409-3418.