

急性髓系白血病分泌型卷曲相关蛋白 5 基因启动子区甲基化状态研究

史晓红 范 芸 周昌虎 宁尚勇 孙 亮 朱小泉 唐 雷 常乃柏 杨 泽

摘 要 **目的** 研究急性髓系白血病(AML)中 WNT 信号传导通路拮抗基因分泌型卷曲相关蛋白 5(SFRP5)基因的甲基化状态。**方法** 应用甲基化特异性 PCR(MSP)法对 99 例 AML 患者的骨髓或外周血进行 SFRP5 基因启动子区甲基化状况检测,并以 70 例门诊普通病人的外周血作为对照。**结果** 99 例 AML 患者中检出 10 例(10.1%)SFRP5 的甲基化,70 例正常对照中仅检出 1 例(1.4%)SFRP5 的甲基化。SFRP5 在 AML 患者中的甲基化率显著高于正常对照($P < 0.05$)。SFRP5 基因的甲基化状态与年龄、性别无关($P > 0.05$),与 AML 的临床分型相关($P < 0.05$)。**结论** SFRP5 基因的甲基化与 AML 有相关性,SFRP5 基因的甲基化可能是引起 AML 的分子机制之一。

关键词 急性髓系白血病 分泌型卷曲相关蛋白 5 基因 甲基化

Methylation Status in the Promoter Region of Secreted Frizzled Related Protein 5 (SFRP5) Gene in Acute Myeloid Leukemia. Shi Xiaohong, Fan Yun, Zhou Changhu, Ning Shangyong, Sun Liang, Zhu Xiaoquan, Tang Lei, Chang Naibai, Yang Ze. Institute of Geriatrics, Ministry of Health, Beijing Hospital, Beijing 100730, China

Abstract Objective To investigate the methylation status in the promoter region of secreted frizzled related protein 5 (SFRP5) gene in acute myeloid leukemia (AML). **Methods** MSP method was applied to examine the promoter methylation of SFRP5 gene in 99 bone marrow or peripheral blood samples of AML patients. As controls, 70 normal peripheral blood samples from volunteers of general outpatients were examined. **Results** All 113 samples were involved in the results analysis. In 99 patients of AML, 10 samples (10.1%) showed SFRP5 gene methylation. In 70 controls, 1 sample (1.4%) showed SFRP5 gene methylation. And all of them were semi-methylation status. The frequency of SFRP5 gene methylation in AML patients was significantly higher than that in controls ($P < 0.05$). There was no significant difference between the different age groups and gender for the results of the methylation status in AML ($P > 0.05$). The methylation status of SFRP5 gene was associated with the clinical classification of AML ($P < 0.05$). **Conclusion** The methylation status of SFRP5 gene was correlated with AML. The methylation of SFRP5 gene may be one of the molecular mechanisms of AML.

Key words AML; SFRP5; Gene; Methylation

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一种常见的恶性血液肿瘤疾病,也是发生在成人中的最普遍的一类急性白血病,其发病主要由于髓系造血干细胞的克隆异常导致异常造血细胞的过度增生、分化受阻及凋亡抑制所致。

DNA 异常甲基化是人类肿瘤中常见的改变,广

泛参与了肿瘤的发生、发展过程。发生在启动子区的 CpG 岛的异常甲基化是基因失活的最常见机制。已有大量研究表明,某些基因的甲基化与 AML 发生、发展密切相关^[1-6]。因此,对于 AML 患者进行基因的甲基化研究对于探索 AML 的发病机制有着积极的意义,并且还有着很好的临床指导意义,可以更好地进行 AML 患者早期发现、早期治疗、改进治疗方案以及评价预后^[6]。

WNT 信号通路与肿瘤发生发展关系的研究越来越受到重视,WNT 信号通路的异常活化参与肿瘤的发生,具有抑制该通路活化作用的因子均能阻滞该通路参与肿瘤的发生^[7-10]。研究发现,WNT 信号通路的拮抗剂分泌型卷曲相关蛋白(secreted frizzled-related protein, SFRPs)家族参与了人类肿瘤的发生,此家族包括 SFRP1~5 共 5 个成员。在多种肿瘤中都

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30972709);卫生部北京医院重点基金资助项目(BJ-2008-76)

作者单位:100730 卫生部北京老年医学研究所(史晓红、周昌虎、孙亮、朱小泉、唐雷、杨泽);卫生部北京医院血液科(范芸、宁尚勇、常乃柏)

共同第一作者:史晓红、范芸

通讯作者:杨泽,研究员,电子信箱:yangze016@yahoo.com.cn;常乃柏,主任医师,电子信箱:changnaibai@sohu.com

发现了 SFRP5 启动子的高甲基化, SFRP5 基因的甲基化导致基因沉默可能与多种肿瘤的发生有关^[11~20]。

我们应用甲基化特异性的 PCR (methylation - specific PCR, MSP) 技术分别检测了 AML 患者(骨髓或外周血)和正常对照(外周血)中 SFRP5 基因启动区的甲基化状态, 探讨 SFRP5 基因启动区甲基化与 AML 发生的关系, 希望能够为 AML 的早期诊断和早期治疗提供有价值的参考依据。

材料与方法

1. 实验材料: (1) 对象: 99 例 AML 患者骨髓或外周血来自笔者医院 2007 年 9 月 ~ 2010 年 10 月的门诊和住院患者, 其中男性 65 例, 女性 34 例, 年龄 10 ~ 81 岁。诊断分型依据急性白血病 FAB 分型标准^[21]。70 例正常对照为来笔者医院内科门诊就诊的普通人群的外周血标本, 其中男性 43 例, 女性 27 例, 年龄 28 ~ 88 岁。(2) 主要试剂: 全基因组 DNA 提取试剂盒购自 Bio Chain 公司; DNA marker 购自天根生化科技(北京)有限公司; 引物由上海生工生物技术有限公司合成; DNA 甲基化试剂盒 (EZ DNA Methylation - Gold Kit), 热启动的 DNA 聚合酶 (ZymoTaq™ DNA Polymerase), 人类基因组甲基化阳性对照和非甲基化的阳性对照等购自美国 Zymo Research 公司。(3) 主要仪器: DNA 定量分析仪为德国 Eppendorf 公司的 Biophotometer 仪; PCR 扩增仪为美国 MJ 公司的 PTC - 225 型 PCR 仪; 凝胶成像系统为美国 Bio - Rad 公司的 Gel DOC - 2000 成像系统。

2. 方法: (1) 基因组 DNA 的提取: 取 EDTA Na₂ 抗凝的骨髓或外周血 0.4ml, 用全基因组 DNA 提取试剂盒抽提基因组 DNA。通过蛋白/核酸比色仪对提取的全基因组 DNA 进行定量和纯度分析, OD260/OD280 的比值均在 1.7 ~ 2.0 之间, -20℃ 保存备用。(2) 甲基化特异性 PCR (methylation - specific PCR, MSP): 采用 DNA 甲基化试剂盒 (EZ DNA Methylation - Gold Kit) 对 400μg 基因组 DNA 进行亚硫酸盐修饰, 然后用甲基化特异性引物和非甲基化特异性引物进行 PCR 扩增。甲基化引物对的上游引物序列为: 5' - TGGCGTTGGGCGGACGTTC - 3', 下游引物序列为: 5' - AACCCGAACCTCGCCGTACG - 3', 退火温度为 55℃, PCR 扩增产物片段为 125bp; 非甲基化引物对的上游引物序列为: 5' - TGGTGTGGGTGGGATGTTT - 3', 下游引物序列为: 5' - CAACCCAAACCTCACCATACAC - 3', 退火温度为 63℃, PCR 扩增产物片段为 126bp。PCR 反应体系为 20μl, 其中包含: 20ng 修饰后的 DNA, 10μmol/L 甲基化或非甲基化上下游引物各 0.4μl, 2X Reaction Buffer 10μl, dNTP Mix (0.25mmol/L each) 0.2μl, ZymoTaq™ DNA Polymerase (5U/μl) 0.16μl, 灭菌 ddH₂O 加至总体积 20μl。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 10min 后进入主循环, 94℃ 变性 30s, 甲基化引物 55℃ 退火 30s (非甲基化引物 63℃ 退火 30s), 72℃ 延伸 40s, 共 40 个循环, 完成后 72℃

继续延伸 10min。(3) 结果判定: 每例样本均用甲基化引物和非甲基化引物分别进行扩增, 扩增产物用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, Bio - Rad 凝胶成像系统成像。若甲基化引物扩增出了特异性条带, 而非甲基化引物未扩增出条带, 则该样本为完全甲基化; 若甲基化引物和非甲基化引物均扩增出了特异性条带, 则该样本为不完全甲基化; 若只有非甲基化引物扩增出了特异性条带, 则该样本为非甲基化。用纯化的人类 HCT 116 DKO 甲基化 DNA 作为甲基化的阳性对照, 用纯化的人类 HCT 116 DKO 非甲基化 DNA 作为非甲基化的阳性对照, 阴性对照用灭菌双蒸水取代处理后的 DNA 模板进行 PCR。实验重复 2 次以确保结果的可靠性。

3. 统计学分析: 采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析, 组间 SFRP5 基因启动子区甲基化发生频率比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异显著性标准。

结 果

1. SFRP5 基因在 AML 患者和正常人群中的甲基化状态: 99 例 AML 患者和 70 正常对照均成功进行了 MSP 检测。99 例 AML 患者中检出 10 例 SFRP5 的甲基化, 甲基化率为 10.1% (均为不完全甲基化); 70 例正常对照中仅有 1 例检出 SFRP5 的不完全甲基化, 甲基化率为 1.4%。SFRP5 在 AML 患者中的甲基化频率显著高于正常对照 ($\chi^2 = 5.164, P = 0.023$)。PCR 产物电泳结果分析见图 1。

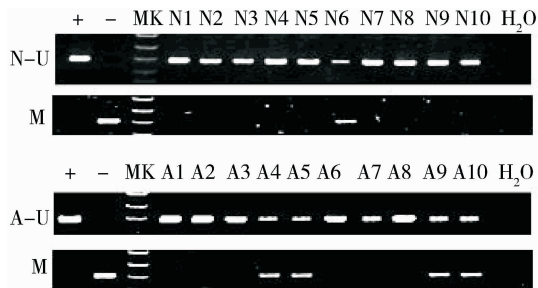


图 1 MS - PCR 检测研究样本的 SFRP5 基因甲基化情况

N. 正常对照; A. AML 患者; +. 甲基化的阳性对照;

-. 非甲基化的阳性对照; MK. DNA marker;

U. 非甲基化引物的扩增产物; M. 甲基化引物的扩增产物

(N6、A4、A5、A9、A10 样本为不完全甲基化;

其他样本均为非甲基化)

2. SFRP5 基因甲基化与 AML 患者临床特征的关系: SFRP5 基因甲基化与 AML 患者临床特征的比较见表 1。SFRP5 基因的甲基化状态与年龄、性别无关, 与 AML 的临床分型相关 ($\chi^2 = 15.66, P = 0.016$)。99 例 AML 患者的样本中, 17 例为骨髓样本, 82 例为外周血样本。本研究中的 10 例甲基化样本全来自于外周血的样本。

表 1 SFRP5 基因甲基化与 AML 患者临床特征之间的关系[*n*(%)]

指标		<i>n</i>	甲基化	非甲基化	χ^2	<i>P</i>
年龄(岁)	≥ 60	22	2(9.1)	20(90.9)	0.032	0.859
	< 60	77	8(10.4)	69(89.6)		
性别	男性	65	6(9.2)	59(90.8)	0.158	0.691
	女性	34	4(11.8)	30(88.2)		
临床分型	M1	3	0(0)	3(100)	15.66	0.016
	M2	32	2(6.3)	30(93.8)		
	M3	18	1(5.6)	17(94.4)		
	M4	9	0(0)	9(100)		
	M5	12	3(25.0)	9(75.0)		
	M6	2	0(0)	2(100)		
	M7	1	1(100)	0(0)		
组织	骨髓	17	0(0)	17(100)		
	外周血	82	10(12.2)	72(87.8)		

讨 论

AML 的发生是一个复杂的、多步骤的过程,除了细胞遗传学的变化外,还存在一种或多种基因的失活,而导致肿瘤抑制基因不能表达。因此,AML 的发生是细胞遗传和表观遗传共同改变的结果^[22]。

DNA 的甲基化是表观遗传学上研究最为深入的一种机制。越来越多的研究表明,DNA 甲基化状态的改变尤其是抑癌基因的过甲基化与 AML 发生、发展密切相关^[1~6,22]。

进来研究表明,大量调节细胞增殖、分化、肿瘤发生的基因都受到 WNT 信号通路的调控。WNT 信号通路的异常活化参与肿瘤的发生,WNT 信号通路的阻断被认为是很多人类恶性肿瘤发生的关键环节^[18]。SFRP 家族包括 SFRP1 ~ 5 共 5 个成员,是 WNT 信号通路的拮抗剂,也是最主要的 WNT 信号通路的抑制因子^[18]。在多种人类恶性肿瘤中,均发现 SFRPs 的表达降低现象。SFRPs 的表达降低,可能造成其对 WNT 信号通路抑制作用的减弱,导致 WNT 信号通路的异常活化,从而引起恶性肿瘤的发生^[18]。目前,尚未发现 SFRP 基因家族在肿瘤中有突变、缺失等改变,但是发现除 SFRP3 基因外,其他成员普遍存在启动子区 CpG 岛的异常甲基化,并且 SFRPs 基因启动子区甲基化可以导致基因自身表达降低^[10,18]。近年的研究发现,SFRP5 基因启动子区的甲基化导致基因沉默可能与多种肿瘤的发生有关,在结肠癌、食管癌、间皮瘤、肺癌、胃癌、肝癌、肾癌、乳腺癌、卵巢癌、贲门腺癌等肿瘤中都发现了 SFRP5 启动子的高甲基化^[11~20]。我们的研究就是要探索 SFRP5 启动子的甲基化状态与 AML 发生、发展的关系。

我们应用 MSP 技术分别检测了 AML 患者和正常对照中 SFRP5 基因启动子区的甲基化状态,结果显示,AML 患者中 SFRP5 基因的甲基化发生率为 10.1% (10/99),而正常对照中基因甲基化率 1.4% (1/70),SFRP5 基因在 AML 患者中的甲基化率显著高于正常对照(*P* < 0.05)。

我们还分析了 SFRP5 基因的甲基化与 AML 患者的临床特征,发现 SFRP5 基因的甲基化与年龄、性别无关,但是与 AML 的临床分型显著关联(*P* < 0.05)。但是由于本研究中样本数量有限,部分 AML 临床分型(M1、M4、M6 和 M7)的患者数量偏少,所以对于 SFRP5 基因的甲基化与 AML 临床分型的关系还需要更大样本量的进一步实验来确证。

另外,一般认为,在基因的甲基化研究取材中应该取病灶组织进行研究,对于 AML 来讲,骨髓应该是有最好的代表性。但是考虑到在正常人群中骨髓组织取样的难以操作性,以及作为 AML 临床早期诊断、早期发现指标的便于推广性,我们对于 AML 患者的研究样本取材分为了骨髓样本和外周血样本 2 个来源,正常对照样本仅采集了外周血。本研究结果显示,AML 患者的 10 例甲基化样本全部来自于外周血的样本。这表明,外周血完全可以用于 AML 患者 SFRP5 基因的甲基化状态检测。另外,由于 SFRP5 基因的甲基化与 AML 显著相关,SFRP5 基因的甲基化可能是引起 AML 的分子机制之一。所以,可以将外周血的 SFRP5 基因的甲基化状态检测作为一项方便、快捷的分子指标推广用于临床检测。

综上所述,SFRP5 基因启动子区的甲基化状态与 AML 的发生、发展相关,外周血中的 SFRP5 基因甲基化状态可以作为一项新的 AML 早期发现,早期诊断的生物分子标志物应用于临床。但是,对于 SFRP5 基因作为一个抑癌基因的确切机制还需要进行深入的功能研究。

参考文献

1 Hess C J,Errami A,Berkhof J, *et al.* Concurrent methylation of promoters from tumor associated genes predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*,2008, 49(6): 1132 - 1141

2 Zangenberg M, Grubach L, Aggerholm A, *et al.* The combined expression of HOXA4 and MEIS1 is an independent prognostic factor in patients with AML. *Eur J Haematol*, 2009,83(5): 439 - 448

3 Link PA,Baer MR,James SR, *et al.* p53 - inducible ribonucleotide reductase (p53R2/RRM2B) is a DNA hypomethylation - independent decitabine gene target that correlates with clinical response in myelodysplastic syndrome/acute myelogenous leukemia cancer Res, 2008, 68(22): 9538 - 9366

- 4 Plass C, Oakes C, Blum W, *et al.* Epigenetics in acute myeloid leukemia. 2008, 35(4): 378 – 387
- 5 Valencia A, Roman – Gomez J, Cervera, *et al.* Wnt signaling pathway is epigenetically regulated by methylation of Wnt antagonists in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2009, 23: 1658 – 1666
- 6 寿倍明, 陈宝安, 刘德龙. 去甲基化在白血病上的研究进展. *中国实验血液学杂志*, 2008, 16(5): 1247 – 1250
- 7 Yamamoto H. Regulation of Wnt signaling pathway and its relationship with tumorigenesis. *Seikagaku*, 2008, 80(12): 1079 – 1093
- 8 杜彦艳, 刘鑫, 单保恩. Wnt/ β – catenin 信号转导通路 with 肿瘤关系的研究进展. *肿瘤*, 2009, 29(8): 803 – 806
- 9 Kikuchi A. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci*, 2003, 94: 225 – 229
- 10 徐成波, 沈建箴, 沈松菲, 等. 恶性血液病细胞系分泌型卷曲相关蛋白基因启动子 CpG 岛甲基化状态的检测及意义. *中国实验血液学杂志*, 2009, 17(6): 1487 – 1491
- 11 Suzuki H, Watkins D N, Jair KW, *et al.* Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet*, 2004, 36: 417 – 422
- 12 Zou H, Molina JR, Harrington JJ, *et al.* Aberrant methylation of secreted frizzled – related protein genes in esophagea adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Int J Cancer*, 2005, 116(4): 584 – 591
- 13 Lee AY, He B, You L, *et al.* Expression of the secreted frizzled – related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene*, 2004, 23: 6672 – 6676
- 14 Castro M, Grau L, Puerta P, *et al.* Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes and clinical outcome in lung cancer. *J Transl Medm*, 2010, 17: 8;86
- 15 Nojima M, Suzuki H, Toyota M, *et al.* Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene*, 2007, 26: 4699 – 4713
- 16 Nomoto S, Kinoshita T, Kato K, *et al.* Hypermethylation of multiple genes as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer*, 2007, 97(9): 1260 – 1265
- 17 Urakami S, Shiina H, Enokida H, *et al.* Wnt antagonist family genes as biomarkers for diagnosis, staging, and prognosis of renal cell carcinoma using tumor and serum DNA. *Clin. Cancer Res*, 2006, 12(23): 6989 – 6997
- 18 Jürgen Veecky, Cordelia Geisler, Erik Noetzel, *et al.* Epigenetic inactivation of the secreted frizzled – related protein – 5 (SFRP5) gene in human breast cancer is associated with unfavorable prognosis. *Carcinogenesis*, 2008, 29(5): 991 – 998
- 19 Su HY, Lai HC, Lin YW, *et al.* Epigenetic silencing of SFRP5 is related to malignant phenotype and chemoresistance of ovarian cancer through Wnt signaling pathway. *Int J Cancer*, 2010, 127(3): 555 – 567
- 20 王馥丽, 靳国梁, 郭炜, 等. 贲门腺癌中分泌型卷曲相关蛋白 4、5 基因启动子区甲基化状态研究. *癌症 畸变 突变*, 2010, 22(1): 14 – 18
- 21 Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, *et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias. French – American – British (FAB) co – operative group. *Br J Haematol*, 1976, 33(4): 451 – 458
- 22 陈燕, 李新刚. 表观遗传修饰与白血病. *中国实验血液学研究*, 2006, 14(4): 635 – 638 (收稿: 2010 – 12 – 05)

高活力原代小鼠肝细胞的分离与纯化

王 燕 周露婷 章卫平 谢志芳

摘 要 目的 建立一种稳定的能获得高活力和高纯度原代小鼠肝细胞的分离和纯化方法。**方法** 对传统的两步原位胶原酶灌注法进行 4 个方面的优化, 主要包括选择逆向灌注、将持续灌注法改为间断灌注后夹闭门静脉法、严格控制胶原酶消化时间和将分离的肝细胞悬液进行低速 Percoll 单密度离心纯化。分离后的肝细胞进行体外培养。肝细胞活力和得率用台盼蓝染色法检测。**结果** 新鲜分离的小鼠原代肝细胞活力能稳定达到 $87\% \pm 3\%$, 平均活细胞总数为 8×10^5 每克小鼠体重, 绝大部分细胞在体外培养 2h 后贴壁生长。**结论** 优化后的肝细胞分离方法更为稳定、有效, 分离到的肝细胞具有高活力的优点。

关键词 小鼠肝细胞 分离 灌注 原代培养

Isolation of Primary Mouse Hepatocytes with High Viability. Wang Yan, Zhou Luting, Zhang Weiping, Xie Zhifang. College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To develop a consistent method for the isolation of primary mouse hepatocytes with high – viability. **Methods**

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772478, 31025013)

作者单位: 200433 上海, 第二军医大学基础部病理生理学教研室 (王燕、周露婷、章卫平); 第二军医大学基础部细胞生物学教研室 (谢志芳)

通讯作者: 谢志芳, 电子信箱: xiezf@smmu.edu.cn