

## 参考文献

- 1 Takashima K, Matsushima M, Hashimoto K, *et al.* Protective effects of intratracheally administered quercetin on lipopolysaccharide - induced acute lung injury[J]. *Res Res*, 2014, 15(1):150
- 2 Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation[J]. *Antioxid Redox sign*, 2014, 20(3):460 - 473
- 3 Villar J, Blanco J, Anon JM, *et al.* The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation[J]. *Intensive Care Med*, 2011, 37(12):1932 - 1941
- 4 Herridge MS, Tansey CM, Matte A, *et al.* Canadian critical care Trials Group: functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(14):1293 - 1304
- 5 Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. *Cell*, 2011, 147(4):728 - 741
- 6 Lamark T, Johansen T. Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy[J]. *Int J Cell Biol*, 2012, 2012:736905
- 7 Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biology*, 2011, 12(1):9 - 14
- 8 Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2):280 - 293
- 9 Shen HM, Codogno P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? [J] *Autophagy*, 2011, 7(5):457 - 465
- 10 Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation[J]. *Nature*, 2011, 469(7330):323 - 335
- 11 Horwacik I, Gaik M, Durbas M, *et al.* Inhibition of autophagy by 3 - methyladenine potentiates sulforaphane - induced cell death of BE(2) - C human neuroblastoma cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1):535 - 542
- 12 Burman C, Ktistakis NT. Autophagosome formation in mammalian cells[J]. *Seminars in Immunopathol*, 2010, 32(4):397 - 413
- 13 Chen C, Deng M, Sun Q, *et al.* Lipopolysaccharide stimulates p62 - dependent autophagy - like aggregate clearance in hepatocytes [J]. *BioMed Res Int*, 2014, 2014:267350
- 14 Liu Q, Zhou DX, Sun L, *et al.* Bone Marrow mesenchymal stem cells ameliorates seawater - exposure - induced acute lung injury by inhibiting autophagy in lung tissue [J]. *Pathol Research International*, 2014, 2014:104962
- 15 Liu QP, Zhou DX, Lin P, *et al.* Participation of autophagy in acute lung injury induced by seawater[J]. *Exp Lung Res*, 2013, 39(10):441 - 452
- 16 Hu R, Chen ZF, Yan J, *et al.* Complement C5a exacerbates acute lung injury induced through autophagy - mediated alveolar macrophage apoptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5:e1330
- 17 Yen YT, Yang HR, Lo HC, *et al.* Enhancing autophagy with activated protein C and rapamycin protects against sepsis - induced acute lung injury[J]. *Surgery*, 2013, 153(5):689 - 698
- 18 Lo S, Yuan SS, Hsu C, *et al.* Lc3 over - expression improves survival and attenuates lung injury through increasing autophagosomal clearance in septic mice[J]. *Ann Surg*, 2013, 257(2):352 - 363
- 19 Wen Z, Fan L, Li Y, *et al.* Neutrophils counteract autophagy - mediated anti - inflammatory mechanisms in alveolar macrophage; role in posthemorrhagic shock acute lung inflammation [J]. *J Immunol*, 2014, 193(9):4623 - 4633

(收稿日期:2015 - 07 - 24)

(修回日期:2015 - 08 - 19)

## DNA 甲基转移酶 DNMT1 与 EZH2 在急性髓系白血病中的表达及相关性研究

吴圣豪 陈松燕 石岳坚 林弼靖 刘 珍 周文锦 郑翠苹

**摘 要** **目的** 探讨 DNA 甲基转移酶 DNMT1 与 EZH2 在急性髓系白血病(AML)中的表达及其相关性。**方法** 采用荧光定量 PCR 技术检测 50 例 AML 患者骨髓细胞中 DNMT1 与 EZH2 mRNA 的表达水平,分析 DNMT1 表达水平与临床特征和预后的关系以及与 EZH2 的相关性。**结果** 50 例 AML 患者骨髓细胞中 DNMT1 mRNA 的表达显著高于 30 例正常供者的( $2.72 \pm 0.73$  vs  $0.89 \pm 0.27$ ,  $P < 0.01$ );EZH2 的表达水平也显著高于正常供者的( $4.39 \pm 1.06$ ,  $1.87 \pm 0.33$ ,  $P < 0.01$ );EZH2 与 DNMT1 的表达水平呈显著正相关( $r = 0.51$ ,  $P = 0.002$ );DNMT1 表达水平与外周血幼稚细胞比例  $\geq 60\%$  ( $P < 0.05$ )、WBC  $\geq 50 \times 10^9/L$  ( $P < 0.05$ ) 显著相关;DNMT1 高表达组患者中位生存时间 15 个月(95% CI:9 ~ 19 个月),显著低于 DNMT1 低表达组患者的 32 个月(95% CI:27 ~ 40 个月)( $P = 0.006$ )。**结论** DNMT1 和 EZH2 在 AML 患者中均高表达,两者表达水平呈正相关,DNMT1 与 AML 患者预后不良相关。

基金项目:温州市科技计划项目(Y20130242)

作者单位:325000 温州市中心医院(温州医科大学定理临床学院)血液化疗科

关键词 DNMT1 EZH2 急性髓系白血病

中图分类号 R5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.04.025

**Relationship between DNMT1 and EZH2 Gene Expression and Clinical Significance in Patients with Acute Myeloid Leukemia.** Wu Sheng-hao, Chen Songyan, Shi Yuejian, et al. Department of Hematology, Wenzhou Central Hospital, Zhejiang 325000, China.

**Abstract Objective** To investigate the relationship between DNMT1 and EZH2 gene expression and clinical significant in patients with acute myeloid leukemia (AML). **Methods** The expressions of DNMT1 and EZH2 mRNA were quantified by real time - PCR in 50 cases of AML and 30 healthy controls. The relationship between DNMT1 and EZH2 and the clinicopathological factors and the prognosis were analyzed. **Results** The expression of DNMT1 mRNA in AML ( $2.72 \pm 0.73$ ) was significantly increased as compared with that in the healthy controls ( $0.89 \pm 0.27$ ,  $P < 0.01$ ). The expression of EZH2 mRNA in AML ( $4.39 \pm 1.06$ ) was also significantly increased compared to that in the healthy controls ( $1.87 \pm 0.33$ ,  $P < 0.01$ ). The expression of DNMT1 was positively associated with EZH2 ( $r = 0.51$ ,  $P = 0.002$ ). Moreover, the expression of DNMT1 was associated with PB% and  $WBC \geq 50 \times 10^9/L$  ( $P < 0.05$ ). The overall survival of DNMT1 mRNA high expression group was 15 months (95% CI: 9 - 19 months), significant shorter than DNMT1 mRNA low expression group (32 months, 95% CI: 27 - 40 months,  $P = 0.003$ ). **Conclusion** The expressions of DNMT1 and EZH2 were down-regulated and associated with poor prognosis in AML. The expression of DNMT1 was positively associated with EZH2.

**Key words** DNMT1; EZH2; AML

表观遗传学变异在白血病的发生、发展和转移中发挥重要作用。组蛋白甲基转移酶 EZH2 是特异性 H3K27 甲基转移酶,通过与 DNA 甲基转移酶 (DNMT1) 合作,致使靶基因 CpG 岛区 DNA 甲基化导致靶基因的永久性沉默,从而参与异染色质的形成及基因转录调控<sup>[1]</sup>。研究表明 EZH2 在多种恶性实体肿瘤组织中表达异常增高,并且具有癌基因的活性<sup>[2]</sup>。近来研究发现 EZH2 在高危骨髓增生异常综合征患者及急性髓系白血病 (AML) 患者中的表达水平显著高于低危 MDS 患者及正常人,提示 EZH2 在髓系恶性肿瘤的发生发展中发挥重要作用<sup>[3,4]</sup>。但是, DNMT1 的表达在 AML 中有何临床意义? EZH2 在 AML 中的表达与 DNMT1 有无相关性? 目前国内还未见相关报道。本研究就 DNMT1 和 EZH2 在 AML 中的表达及其相关性,以及与 AML 临床特征、预后的关系做初步探讨,为急性白血病的治疗提供新的思路。

### 资料与方法

1. 一般资料:收集温州市中心医院血液化疗科 50 例初治 AML 患者。所有病例均经骨髓形态细胞学检查、免疫组织化学染色或流式细胞术免疫分型确诊。按照 FAB 白血病诊断分型标准<sup>[5]</sup>,其中 M<sub>1</sub> 8 例, M<sub>2</sub> 13 例, M<sub>4</sub> 12 例, M<sub>5</sub> 17 例。男性 33 例,女性 17 例;患者中位年龄 42.5 (12 ~ 62) 岁;中位 WBC 计数为  $38.9 (1.9 \sim 359.7) \times 10^9/L$ ;外周血原幼稚细胞比例中位数为 61 (5 ~ 87)%。对照组为 30 例正常供者。所有标本的采集均获得笔者医院伦理委员会批准并征得患者或者家属的同意。

2. 骨髓单个核细胞分离:常规骨髓穿刺,抽取患

者骨髓液 3 ~ 5ml,肝素抗凝,采用淋巴细胞分离液分离出骨髓单个核细胞, PBS 洗涤 2 遍后加 1ml Trizol 反复吹打至无沉淀, -80℃ 保存备用。

3. 总 RNA 提取:按 Trizol 说明书进行操作抽提总 RNA。DEPC 水溶解后采用分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度,  $A_{260}/A_{280} > 1.8$  方可用于后续反转录。

4. 反转录反应:按照 TAKARA 公司的 PrimeScript 反转录试剂盒说明书进行。将 1μg 总 RNA, 1μl Oligo (dT)<sub>18</sub>, 1μl dNTPmix 充分混匀后,置 65℃ 作用 5min 后迅速冰上冷却,再加入 4μl 5 × PrimeScript 缓冲液, 1μl Ribonuclease Inhibitor, 最后加入 1μl Enzyme Mix 反转录酶 (200U/μl) 至终体积为 20μl, 42℃ 作用 1h, 70℃ 作用 10min 后冰上冷却,获得的 cDNA 第一链立即行 PCR 或 -80℃ 冰箱保存待用。

5. 荧光定量 PCR:应用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (Applied Biosystems) 进行检测。EZH2 上游引物:5' - GACCTGACCTCTGTCTTACTT - 3', 下游引物:5' - GATGGTGCCAGGCAATAGATG - 3'。DNMT1 上游引物:5' - AACCTTCACCTAGCCCCAG - 3', 下游引物:5' - CTCATCCGATTTGGCTCTTCA - 3'。内参 GAPDH 上游引物:5' - TGAAGGTCCGAGT-CAACGG - 3', 下游引物:5' - CTGGAAGATGGTGAT-GGGATT - 3'。PCR 扩增条件:95℃ 30 s, 95℃ 5s, 60℃ 40s, 40 个循环。所有反应设置 3 个复孔。采用相对定量法,以  $2^{-\Delta Ct}$  表示标本中目的基因的相对表达量,其中  $\Delta Ct = (Ct_{EZH2} / Ct_{DNMT1} - Ct_{\beta-actin})$ 。

6. 统计学方法:应用 SPSS 16.0 统计软件分析,数据均以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。DNMT1 表达水

平用  $2^{-\Delta Ct}$  表示,经乘以 1000 后取 lg 数据转换后符合正态分布,选用两样本  $t$  检验或校正  $t$  检验;相关分析选用 Pearson 相关, Kaplan - Meier 法绘制生存曲线, log - rank 法进行生存分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. DNMT1 在 AML 患者中的表达:荧光定量 PCR 结果显示,50 例 AML 患者骨髓细胞中 DNMT1 mRNA 的表达值为  $2.72 \pm 0.73$ ,显著高于 30 例正常供者  $0.89 \pm 0.27$  ( $P < 0.01$ )。

2. EZH2 在 AML 中的表达及其与 DNMT1 的相关性:EZH2 在 50 名 AML 患者骨髓细胞中的表达水平为  $4.39 \pm 1.06$ ,显著高于 30 例正常供者的  $1.87 \pm 0.33$  ( $P < 0.01$ )。相关性分析显示,EZH2 mRNA 在 AML 患者骨髓细胞中的表达水平与 DNMT1 mRNA 的表达水平均呈显著正相关,相关系数  $r = 0.51$  ( $P = 0.002$ ,图 1)。

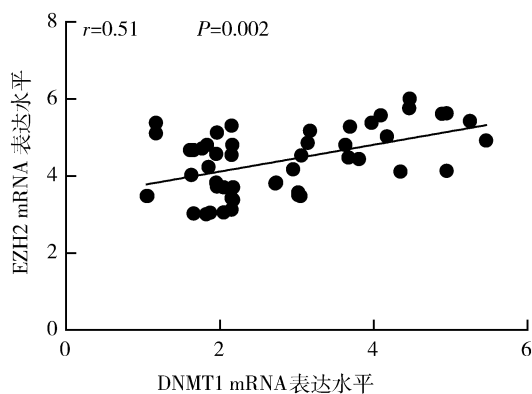


图 1 DNMT1 表达水平与 EZH2 表达水平呈正相关

3. DNMT1 表达水平与临床特征之间的关系:AML 患者骨髓细胞中的 DNMT1 mRNA 表达水平与外周血幼稚细胞比例  $\geq 60\%$  ( $P < 0.05$ )、WBC  $\geq 50 \times 10^9/L$  ( $P < 0.05$ ) 呈显著正相关,而与性别、年龄、骨髓中幼稚细胞比例、LDH 水平以及染色体核型相关预后均不相关(表 1)。

4. DNMT1 表达水平与 AML 患者预后的关系:所有病例中位随访时间为 16 (3 ~ 43) 个月,19 例 (38%) 患者死亡。以 DNMT1 mRNA 表达水平中位值  $2^{-\Delta Ct} = 2.16$  作为截断值,将 DNMT1 在 AML 中的表达分为高表达组和低表达组。Kaplan - Meier 生存分析表明,DNMT1 高表达组患者中位生存时间 15 个月 (95% CI:9 ~ 19 个月),显著低于 DNMT1 低表达组患者的 32 个月 (95% CI:27 ~ 40 个月),差异有统计学意义 ( $P = 0.006$ )。

表 1 DNMT1 表达水平与 AML 患者临床特征之间的关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 临床病理特征                  | DNMT1 mRNA |                 | P     |
|-------------------------|------------|-----------------|-------|
|                         | n          | $\bar{x} \pm s$ |       |
| 年龄 (岁)                  |            | $2.72 \pm 0.73$ |       |
| <40                     | 30         | $2.77 \pm 0.64$ | 0.634 |
| $\geq 40$               | 20         | $2.69 \pm 0.76$ |       |
| 性别                      |            |                 |       |
| 男性                      | 33         | $2.76 \pm 0.72$ | 0.369 |
| 女性                      | 17         | $2.69 \pm 0.70$ |       |
| BM (%)                  |            |                 |       |
| <60                     | 22         | $2.57 \pm 0.69$ | 0.741 |
| $\geq 60$               | 28         | $2.78 \pm 0.74$ |       |
| PB (%)                  |            |                 |       |
| <60                     | 22         | $2.34 \pm 0.65$ | 0.017 |
| $\geq 60$               | 28         | $2.97 \pm 0.75$ |       |
| WBC                     |            |                 |       |
| $< 50 \times 10^9/L$    | 21         | $2.41 \pm 0.77$ | 0.021 |
| $\geq 50 \times 10^9/L$ | 29         | $2.97 \pm 0.68$ |       |
| LDH                     |            |                 |       |
| 正常                      | 12         | $2.64 \pm 0.59$ | 0.159 |
| 升高                      | 38         | $2.89 \pm 0.78$ |       |
| 染色体核型预后分组               |            |                 |       |
| 良好                      | 14         | $2.34 \pm 0.54$ | 0.094 |
| 中危                      | 31         | $2.89 \pm 0.69$ |       |
| 高危                      | 6          | $2.64 \pm 0.81$ |       |

## 讨 论

急性髓系白血病 (AML) 是发生于造血干/祖细胞的恶性增殖性疾病。表观遗传学变异在白血病的发生、发展和转移中发挥重要作用。近年来,染色体甲基化异常逐渐成为 AML 研究的热点,AML 中存在一组基因的高度甲基化,导致这些基因表达的沉默或抑制,从而促进正常造血干细胞向白血病细胞的转化。EZH2 基因 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 是果蝇 ZESTE 基因增强子的人类同源物,其编码蛋白含有高度保守的 SET 结构域,可甲基化组蛋白 H3K27,通过调节染色体组蛋白的甲基化状态而沉默分化基因<sup>[6]</sup>。

EZH2 导致靶基因高度失活的机制有两种,一种是通过与 DNA 甲基转移酶 (DNMT1) 合作,致使靶基因 CpG 岛区 DNA 甲基化导致靶基因的永久性沉默;另一种是先通过 PRC2 (多梳抑制复合物) 催化 H3K27me3,甲基化的 H3K27 再作为锚定点结合 HPC,再招募 PRC1 的其他蛋白结合至靶基因的 polycomb 反应元件来共同完成的<sup>[2]</sup>。DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 1 是介导 DNA 甲基化的主要元件,其对沉默靶基因的甲基化作用中受到了 EZH2 作为上游因子的调控作用<sup>[7]</sup>。笔者前期的研究表明 EZH2 在 AML 中高表达,且与临床高白细胞和血清 LDH 水平升高显著相关,同时 EZH2 高表

达患者预后较低表达者差<sup>[4]</sup>。然而 DNMT1 在 AML 中的表达及其与 EZH2 的表达有无相关性目前尚不清楚。

本研究中笔者应用荧光定量 PCR 方法检测了 50 例 AML 患者 DNMT1 的表达情况,发现 DNMT1 在 AML 患者的骨髓细胞中显著高表达,而且其表达水平与其上游调控基因 EZH2 呈显著正相关。冯琳等<sup>[8]</sup>研究发现 DNMT1 在儿童 ALL 中也呈现高表达,阳性率高达 73.2%。乔淑凯等<sup>[9]</sup>研究发现 DNMT1 基因在成人 ALL 患者有异常高表达,其表达水平与抑癌基因 p15INK4B、mdr1 表达呈明显负相关。这些研究结果提示 DNMT1 与 EZH2 相互作用,调控了抑癌基因的启动子甲基化,导致其转录失活,从而导致白血病恶性克隆的形成。然而 DNMT1 如何与 EZH2 相互作用,其具有机制还有待于深入研究。

本研究还发现,表达与 DNMT1 mRNA 表达水平与外周血幼稚细胞比例、WBC 计数呈显著正相关,提示 DNMT1 能够促使白血病细胞从骨髓释放到外周血,迁移至髓外形成浸润病灶。而且 DNMT1 高表达的患者预后较低表达者差,表明 DNMT1 可能是 AML 患者预后的判断指标。

## 参考文献

- 1 常乃柏. 急性髓系白血病 DNA 甲基化及治疗进展[J]. 中华临床医师杂志:电子版, 2013, 12: 5504-5506
  - 2 杨青梅, 白松, 雷又鸣, 等. EZH2 的功能及在肿瘤中的表达[J]. 中国老年保健医学, 2014, 6: 72-75
  - 3 Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, *et al.* Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(8): 665-607
  - 4 吴圣豪, 郑翠苹, 徐杰. EZH2 和 microRNA-101 在急性髓系白血病中的相关性分析及对预后的影响[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(3): 232-235
  - 5 Bennett JM, Catovsky D, Daniel M T, *et al.* Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group [J]. *Ann Intern Med*, 1985, 103(4): 620-625
  - 6 范晨宇, 赵建农, 朱蔚林. EZH2 与肿瘤相关性研究进展[J]. 海南医学, 2015, 10: 1469-1471
  - 7 苏玉, 王溪, 朱卫国. DNA 甲基转移酶的表达调控及主要生物学功能[J]. 遗传, 2009, 31(11): 1087-1093
  - 8 冯琳, 乔淑凯, 徐世荣. 急性白血病患者 DNA 甲基转移酶基因表达的临床预后价值[J]. 实用儿科临床杂志, 2009, 24(3): 203-205
  - 9 乔淑凯, 徐世荣, 郭晓楠, 等. 急性白血病患者 DNA 甲基转移酶基因的表达及其临床意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13(2): 260-265
- (收稿日期:2015-09-09)  
(修回日期:2015-10-18)

# 老年 2 型糖尿病患者营养风险调查及其与膳食摄入、糖化血红蛋白的关系

林 兵 王亚非 石 劭

**摘 要 目的** 评估老年 2 型糖尿病患者的营养状况,分析营养不良的发生与膳食摄入、糖化血红蛋白(HbA1c)的关系。**方法** 调查中日友好医院内分泌科 2014 年 9 月~2015 年 3 月的诊断为 2 型糖尿病的年龄 >55 岁的住院患者,根据体重指数(BMI)分为低 BMI 组/营养不良组、正常组、超重组和肥胖组 4 组。入院当天采用 24h 膳食回顾法调查营养素的摄入量。检测血清白蛋白和 HbA1c 水平,计算营养风险指数(NRI),据此分为营养不良组和营养正常组,比较各组间患者的营养素摄入水平和糖化血红蛋白水平。**结果** 完成调查 118 例,基于 BMI 的营养不良发生率为 5.9%(7/118),NRI 评分的营养不良发生率为 12.7%(15/118)。低 BMI 组患者每日摄入的能量、糖类和脂肪较肥胖组低( $P<0.05$ ),但是较正常组和超重组差异无统计学意义。NRI 营养不良组较营养正常组的能量摄入和蛋白质均明显降低( $P<0.05$ )。NRI 营养不良组的血糖水平明显高于营养正常组,而低 BMI 组的 HbA1c 水平较低,随着 BMI 的增长,HbA1c% 有升高的趋势,肥胖组的 HbA1c 水平明显高于低 BMI 组( $P<0.05$ )。**结论** 老年 2 型糖尿病患者面临着营养不良的问题,且 NRI 营养不良患者的 HbA1c% 更高,而减轻体重有助于维持较低的 HbA1c 水平。限制膳食摄入有助于降低体重,同时也增加了 NRI 营养不良风险,评估患者营养风险是必要的。

**关键词** 营养风险指数 营养不良 糖尿病 糖化血红蛋白 膳食摄入

中图分类号 R587

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.04.026

作者单位:100029 北京,中日友好医院营养科

通讯作者:石劭,电子信箱:shimai2003@163.com