

DAPK 启动子区异常甲基化模式在白血病 诊断分型中的价值分析*

阮红刚¹ 赵铮¹ 许腊梅² 付潮鸿¹

[摘要] 目的:探讨抑癌基因 DAPK 启动子区异常甲基化模式作为潜在肿瘤标志物在白血病诊断分型中的价值。方法:采取亚硫酸氢盐测序法(BSP)对白血病细胞株和正常人外周血白细胞中抑癌基因 DAPK 启动子的异常甲基化模式进行分析;利用甲基化特异性 PCR 法(MSP)检验 DAPK 基因异常甲基化模式对于白血病诊断的效能。结果:Jurkat、U937、HL-60 3 种细胞株的甲基化水平和正常细胞株比较差异有统计学意义($\chi^2 = 90.736, P < 0.05$; $\chi^2 = 67.493, P < 0.05$; $\chi^2 = 753.284, P < 0.05$),提示肿瘤细胞的甲基化水平远高于正常细胞,且 HL-60 细胞株中的 DAPK 基因甲基化水平显著高于 Jurkat 和 U937 细胞株。ANLL 用 MSP 甲基化检测时特异度、准确度和灵敏度分别为 100%(61/61)、82.9%(87/105)和 58.7%(27/46),未发现白血病病理分型和 MSP 诊断之间的关系。结论:抑癌基因 DAPK 启动子区异常甲基化模式作为一种潜在肿瘤标志物,极大丰富了临床诊断白血病的方法,对于白血病的诊断分型有重要的临床意义。

[关键词] 白血病;抑癌基因;DNA 甲基化;DA PK 基因甲基化模式;启动子

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2018.08.006

[中图分类号] R733.1 **[文献标志码]** A

Analysis of the value of abnormal methylation pattern in the promoter region of DAPK in the diagnosis of leukemia

RUAN Honggang¹ ZHAO Zheng¹ XU Lamei² FU Chaohong¹

(¹Department of Clinical Laboratory, Dongfeng Hospital Attached to Hubei Medical College, Shiyan, 442000, China; ²Operation Room, Dongfeng Hospital Attached to Hubei Medical College)

Corresponding author: ZHAO Zheng, E-mail: zhaozheng780@163.com

Abstract Objective: To investigate the value of abnormal methylation pattern of DAPK promoter region in the promoter region of tumor suppressor gene as a potential tumor marker in the diagnosis of leukemia. **Method:** Take the sulfurous acid hydrogen salt sequencing(BSP)on leukemia cell lines and normal human peripheral blood leukocytes in inhibiting cancer gene DAPK promoter abnormal methylation patterns were analyzed; with a methylation specific PCR(MSP)inspection and DAPK gene methylation mode for performance diagnosis of leukemia. **Result:** Jurkat, U937, HL-60 three cell lines of methylation and significant difference compared with the normal cell lines ($\chi^2 = 90.736, P < 0.05$; $\chi^2 = 67.493, P < 0.05$; $\chi^2 = 753.284, P < 0.05$), indicating the level of methylation of tumor cells is much higher than normal cells, and HL 60 cell lines of DAPK gene methylation level was significantly higher than that of Jurkat and U937 cell lines. ANLL with MSP methylation detection specific degrees, accuracy and sensitivity was 100%(61/61), 82.9%(87/105) and 58.7%(27/46), leukemia are not found in the relationship

* 基金项目:2012 年度省教育厅科研计划项目(No:D20122404)

¹湖北医药学院附属东风医院检验科(湖北十堰,442000)

²湖北医药学院附属东风医院手术室

通信作者:赵铮, E-mail: zhaozheng780@163.com

- [7] Alexopoulou A, Karayiannis P. HBeAg negative variants and their role in the natural history of chronic hepatitis B virus infection[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20:7644-7652.
- [8] Toita R, Kawano T, Kang JH, et al. Applications of human hepatitis B virus preS domain in bio-and nano-technology[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21: 7400-7411.
- [9] Selzer L, Zlotnick A. Assembly and Release of Hepatitis B Virus[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015, 5:a021394.
- [10] 程振波, 谭黎明, 李建英, 等. 乙型肝炎病毒感染患者血清 HBV-LP 检测意义及其与 Pre S1 抗原、HBV DNA 之间关系的研究[J]. 实用预防医学, 2016, 23(4): 487-489.
- [11] 候玲, 徐晚枫. 乙型肝炎(HBV)感染临床治愈后的长期预后[J]. 日本医学介绍, 2004, 25(11): 510-510.
- [12] 庄辉. HBsAg 消失或血清学转换是慢性乙型肝炎理想的治疗终点[J]. 中国病毒病杂志, 2017, 7(5): 324-327.
- [13] Jiang WC. Analysis on synchronous test of HBV-M and HBV-DNA in 650 patients with chronic hepatitis[J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2013, 22: 141-143.

(收稿日期:2017-11-24)

between the pathological classification and MSP diagnosis. **Conclusion:** As a potential tumor marker, the abnormal methylation pattern of DAPK promoter region of tumor suppressor gene is a potential tumor marker, which greatly enriches the methods of clinical diagnosis of leukemia, and has a very important clinical significance for the diagnosis of leukemia.

Key words leukemia; anti-oncogene; DNA methylation; methylation pattern of DAPK gene; promoter

抑癌基因 DAPK 是机体内进行调节细胞正性凋亡的因子之一,有诸多资料显示抑癌基因 DAPK 的启动子区域出现甲基化表达和临床上血液肿瘤的发生、发展、临床治疗及预后效果存在极为重要的关系,同时在白血病细胞出现可分辨的病理组织形态前即可检出启动子区异常甲基化现^[1]。DNA 甲基化异常是一种白血病发生和发展的重要分子机制,特别是抑癌基因启动甲基化引起的基因沉默,已是引起其功能失活的主要影响机制之一^[2]。在细胞恶变期间,启动子区甲基化异常可作为频发、早期的分子事件之一,并且在临床确诊肿瘤前即可检出特异基因的异常甲基化情况^[3]。为了对白血病进行更深入的探索以及尽可能地提高其早期诊断,我院展开相关研究,探讨抑癌基因 DAPK 启动子区异常甲基化模式作为潜在肿瘤标志物在白血病诊断分型中的价值。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

美国伯乐公司出产的全自动凝胶成像系统;日本岛津公司生产的型号为 AUW220D 的电子天平;北京六一出产的 DYCP-31C 型水平电泳仪;美国 ABI 公司出产的型号为 ABI9700 的 PCR 仪;上海出产的 UV-9000 型紫外分光光度计;美国赛默飞世尔公司出产的二氧化碳培养箱和超低温冰箱以及冷冻离心机;江苏太仓出产的 HZ-25 型空气恒温振荡器;上海出产的 SPX-150 型微生物培养箱。

1.2 实验材料

达安基因股份有限公司出产的 DH5a 菌株;上海生工生物工程公司的氨卞青霉素;美国 Gibco 公司的 RPMI 1640 培养液;英国 Oxoid 公司的 LB 培养液;白血病细胞株 U937 和 HL-60 以及 Jurkat 均采购于中国科学院上海细胞所;德国 Qiagen 公司出产的 PCR 产物回收试剂盒和 DNA 提取试剂盒。此外,本次研究中所采用的白血病患者外周血和正常人外周血均采集于我院白血病患者及同期来我院检查的健康人,经我院医学伦理委员会批准和被采集者的知情同意后进行本次研究。

1.3 培养细胞株及提取基因组 DNA

在湿度饱和和含有 5% 二氧化碳以及温度为 37℃ 的培养箱中,利用含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液对 Jurkat、U937 和 HL-60 细胞株进行培养,每隔 2~3 d 进行一次换液以完成传代。严

格按照 DNA 提取试剂盒的说明书进行 Jurkat、U937、HL-60 3 种细胞株和白血病患者以及正常健康人的外周血白细胞的基因提取。

1.4 亚硫酸氢盐修饰 DNA

将 1 μg 的 DNA 在纯水中进行溶解并且将体积补足至 45 μg ,将 5 μg 新配制的 3 mol/L 的氢氧化钠溶液与之进行充分混合,在温度为 42℃ 的条件下将两者混合物进行 20 min 的水浴变性;将 520 μl 新配制的浓度为 4.2 mol/L、pH 为 5.0 的亚硫酸氢钠溶液和 30 μl 浓度为 10 mmol/L 的氢醌溶液加入上述变性后的 DNA 溶液中均匀混合,采取石蜡油对液面进行封盖,在温度为 55℃ 且避光条件下进行 16 h 的水浴加热,依据 Wizard 纯化试剂盒的说明书对 DNA 进行脱盐纯化操作,并且加入 40 μl 的 TE 进行溶解,保存于零下 20℃ 环境中备用。

1.5 BSP 扩增与产物克隆测序

采取巢式 PCR 方法在 50 μl 的体系之中进行扩增反应,利用感受态大肠杆菌 DH5a 和 pMD18-T 载体对扩增产物实施连接和转化完成 TA 克隆,将扩增不特异的 PCR 产物先行割胶纯化后再实施克隆,对于扩增特异并且效率较高的产物则直接进行克隆,摇菌鉴定阳性的克隆每个挑出 5~10 个菌液由上海生工生物工程公司进行测序。

1.6 MSP 引物设计与扩增

用 Oligo 7.0 软件对甲基化胞嘧啶‘C’和非甲基化胞嘧啶‘C’各设计一对甲基化引物(M)和非甲基化引物(U);在 25 μl 的体系之中进行 MSP 的扩增,并且取 10 μl 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳成像,最后对扩增结果进行相应判断。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,试验所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,计数资料之间对比采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。其中 CpG 位点甲基化率 = (修饰后 CpG/原始序列 CpG 数目) $\times 100\%$ ^[4]。

2 结果

2.1 各细胞基因组中 DAPK 基因的整体甲基化水平

本次研究中用甲基化的 CpG 位点数在 CpG 总数中所占比值来表示各细胞基因组中 DAPK 基因的总体甲基化水平,而本次研究结果中 Jurkat、U937、HL-60 3 种细胞株的甲基化水平和正常细

胞株比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 90.736, P < 0.01$; $\chi^2 = 67.493, P < 0.01$; $\chi^2 = 753.284, P < 0.01$), 提示肿瘤细胞的甲基化水平远高于正常细胞, 且 HL-60 细胞株中的 DAPK 基因甲基化水平显著高于 Jurkat 和 U937 细胞株, 见表 1。并且根据统计分析学显示, DAPK 甲基化的频率在各疾病亚型中无显著相关性, 而 DAPK 甲基化在各亚型中的分布情况则见表 2、3。

2.2 MSP 引物序列

根据上述结果可以得出 DAPK 基因在 Jurkat、U937、HL-60 3 种细胞株之间存在特异 CpG 位点, 因此, 针对该特异位点设计出一套去甲基化引物(U)和甲基化引物(M), 见表 4。

2.3 白血病患者外周血的 MSP 检测结果

由于临床上白血病的分型复杂多样, 因此将检测标本分为正常对照组和慢性髓系白血病(CML)、急性非淋巴细胞白血病(ANLL)以及急性淋巴细胞白血病(ALL), 各组 DAPK 基因的 MSP 检测结果见表 5。其中 ANLL 用 MSP 甲基化检测时特异度、准确度和灵敏度分别为 100% (61/61)、82.9% (87/105) 和 58.7% (27/46), 未发现白血病病理分型和 MSP 诊断之间的关系。

表 1 不同基因组的甲基化水平

组别	CpG 位点	TpG 位点	总数	甲基化水平/%
正常细胞组	13	374	387	3.36
Jurkat	149	407	556	26.80
U937	118	432	550	21.45
HL-60	449	111	560	80.18

与正常细胞组比较, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 AML 甲基化与 DAPK 之间的关系

AML 分类	总例数	甲基化例数	百分比/%
M ₁	4	0	0
M ₂	30	9	30.0
M ₃	27	10	37.0
M ₄	5	1	20.0
M ₅	33	15	45.5
M ₆	7	3	42.9

表 3 ALL 甲基化与 DAPK 之间的关系

ALL 分类	总例数	甲基化例数	百分比/%
L ₂	18	8	44.4
L ₃	4	0	0

表 4 甲基化特异性 PCR 法扩增 DAPK 基因的引物

基因	状态	引物序列 (5'-3')	碎片长度/bp
DAPK	甲基化	F GAGGGCTGATGCTAGCGT	288
		R CTCAGCTCTCCACCGCGC	
	非甲基化	F TGGAGGGTTGATGTAGTGTG	292
		R ACTCTCCACCACACCC	

表 5 白血病患者血浆样本中 MSP 检测结果

组别	阳性数(+)	阴性数(-)	总数
ANLL 组	26	18	44
ALL 组	0	35	35
CML 组	0	25	25
正常对照组	0	30	30

3 讨论

白血病是临床上较为常见的一种血液系统恶性肿瘤, 通常会有不同程度的贫血和出血现象, 以及肝、脾和淋巴结肿大等, 其发病率在我国各种肿瘤中排第 6 位。据有关资料显示, 在白血病早期甚至在白血病发生之前即会有 DNA 启动子甲基化情况出现, 而抑癌基因启动子区 CpG 岛的高甲基化和白血病的发生、发展关系密切, 使抑癌基因出现突变和丢失, 进而对白血病患者造成第二次打击^[5]。在特定的基因组中特定的基因由多个或单一 CpG 位点甲基化状态组成的具有特征性甲基化标志的情况即为所谓的 DNA 甲基化模式, 其作为

诊断标记对比于传统的肿瘤标志物具有检测多点突变、方便设定内对照、DNA 分子稳定等优势^[6]。因此, 抑癌基因 DAPK 启动子区甲基化现象可作为新型的肿瘤标志物之一, 有助于对临床白血病的早期诊断及预后效果评估提供新的依据。

临床上 DAPK 基因在肿瘤细胞中之所以表达低下甚至失表达, 其重要原因之一即该基因的启动子 CpG 岛高甲基化^[7]。作为抑癌基因, DAPK 的低表达和许多部位的肿瘤均有密切关系, 其中包括泌尿生殖部位、消化道、呼吸道、头颈部以及造血系统等^[8]。本研究中通过对 CpG 位点的甲基化模式进行探索发现, DAPK 基因在白血病细胞株中的主要表现为部分甲基化甚至完全甲基化, 各个白血病细胞株中的甲基化模式又各不相同, 而正常细胞中 DAPK 基因则均以去甲基化为主^[9]。有研究报道, 大量的 HL-60 特异的完全甲基化位点, 在把 HL-60 和其他细胞区分开后筛选出髓系白血病潜在的变异甲基化位点, 进而通过 MSP 方法在细胞株中检验这些位点的诊断效能。白血病患者病灶组织在

于骨髓,并且患者的外周血中细胞外游离 DNA 含量显著升高。白血病细胞株在临床研究中具有经济、基因组单一以及可重复等优势,但是终究不能完全用以衡量白血病肿瘤细胞的基因甲基化状态,本次研究从细胞株入手的主要原因就是考虑到其细胞具有纯粹性的缘故,避免白血病患者之间的肿瘤细胞差异以及其他基因组 DNA 的干扰。

本研究中首先对肿瘤细胞株基因启动子甲基化模式利用亚硫酸氢盐测序法进行测序,在筛选出特异 CpG 位点后采取甲基化特异性 PCR 方法对临床标本进行检测,从而验证其诊断效能,最终促进白血病等恶性肿瘤的早期诊断以达到实用于临床的目的。在本次研究结果中 Jurkat、U937、HL-60 3 种细胞株的甲基化水平和正常细胞株比较差异有统计学意义,提示肿瘤细胞的甲基化水平远高于正常细胞,且 HL-60 细胞株中的 DAPK 基因甲基化水平显著高于 Jurkat 和 U937 细胞株。而 ANLL 用 MSP 甲基化检测时特异度、准确度和灵敏度分别为 100% (61/61)、82.9% (87/105) 和 58.7% (27/46),未发现白血病病理分型和 MSP 诊断之间的关系。由于本次研究为了早期诊断和取材方便的目的,所以检测标本并非采用骨髓进行检测,而是采取正常人和白血病患者的外周血作为标本进行检测,因此所检测的肿瘤细胞数目相对骨髓较少;其次有限的克隆测序不能对所有甲基化状态进行完全分析,其选择的位点也未必全面;患者之间的肿瘤细胞存在个体差异,因此本次研究所得的结果还有待进一步的深入研究探讨。

综上所述,抑癌基因 DAPK 启动子区异常甲基化模式作为一种潜在肿瘤标志物,极大丰富了临床诊断白血病的方法,对于白血病的诊断分型有极为重要的临床意义,值得广大科研人员进行更深层次的研究探讨。

参考文献

- [1] Alizad Ghandforoush N, Chahardouli B, Rostami S, et al. Evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with NPM1 marker[J]. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 2016, 10: 147—152.
- [2] Mohammadi S, Ghaffari SH, Shaiegan M, et al. Curcumin veto the effects of osteopontin(OPN) specific inhibitor on leukemic stem cell colony forming potential via promotion of OPN overexpression[J]. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 2016, 10: 120—129.
- [3] Mahmud H, Kornblau SM, Ter EA, et al. Epidermal growth factor receptor is expressed and active in a subset of acute myeloid leukemia[J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9: 64.
- [4] Shah MV, Hook CC, Call TG, et al. A population-based study of large granular lymphocyte leukemia[J]. *Blood Cancer J*, 2016, 6: e455.
- [5] Hayashi A, Tanoshima R, Tsujimoto SI, et al. Crizotinib treatment for refractory pediatric acute myeloid leukemia with RAN-binding protein 2-anaplastic lymphoma kinase fusion gene[J]. *Blood Cancer J*, 2016, 6: e456.
- [6] Hidalgo Lopez JE, Yabe M, Carballo-Zarate AA, et al. Donor-derived T-cell large granular lymphocytic leukemia in a patient with peripheral T-cell lymphoma[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2016, 14: 939—944.
- [7] 苏庸春, 徐红珍, 于洁, 等. 5-氮杂胞苷对 HL60 细胞 P16、DAPK 及 MGMT 基因甲基化状态影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2012, 37(10): 864—867.
- [8] 赵卫华, 孟凡义, 赖永榕, 等. DAPK 过表达对 HL-60 细胞生物学功能及 caspase-3 表达的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(5): 729—732.
- [9] Kalaycio M. Your patient has chronic leukemia: Now what[J]. *Cleve Clin J Med*, 2016, 83: 575—581.

(收稿日期: 2017-12-26)