

急性髓系白血病患者 SFRP2 基因甲基化的检测及临床意义

史晓红 常乃柏 范芸 周昌虎 宁尚勇 孙亮 杨泽

【摘要】 **目的** 检测分泌型卷曲相关蛋白 2 (SFRP2) 基因在急性髓系白血病 (AML) 患者中的甲基化状态,探讨 SFRP2 基因启动子区甲基化状态与 AML 发生的关系。**方法** 收集了 99 例 AML 患者的骨髓或外周血样本,匹配以 70 例门诊普通患者的外周血作为对照。采用甲基化特异性 PCR (MSP) 方法对所有研究样本进行 SFRP2 基因启动子区甲基化状况检测。**结果** 99 例 AML 患者中有 27 例检测到 SFRP2 基因的甲基化,甲基化率为 27.3%;而正常对照组中未检出 SFRP2 基因的甲基化;两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。SFRP2 基因的甲基化状态与 AML 的年龄、性别、临床分型及样本来源 (骨髓/外周血) 间均未见显著关系 ($P > 0.05$)。**结论** SFRP2 基因启动子区的甲基化与 AML 的发生有相关性,可能是引起 AML 的分子机制之一。外周血中的 SFRP2 基因的甲基化可望作为一项新的分子标记物应用于 AML 的临床早期检测。

【关键词】 白血病,髓样,急性; 启动区(遗传学); 甲基化特异性 PCR; 分泌型卷曲相关蛋白 2 基因

Detection and clinical significance of SFRP2 promoter methylation status in patients with acute myeloid leukemia SHI Xiao-hong, CHANG Nai-bai, FAN Yun, ZHOU Chang-hu, NING Shang-yong, SUN Liang, YANG Ze. The Key Laboratory of Geriatrics, Beijing Hospital & Institute of Geriatrics, Ministry of Health, Beijing 100730, China

Corresponding author: YANG Ze, Email: yangze016@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** To detect secreted frizzled related protein 2 (SFRP2) gene promoter methylation status in patients with acute myeloid leukemia (AML), and to explore whether the methylation status of SFRP2 gene is associated with the occurrence of AML. **Methods** 99 bone marrow or peripheral blood samples of AML patients was collected, and out-matched with 70 normal peripheral blood samples from volunteers of general outpatients. Methylation specific PCR (MSP) method was used to detect the promoter methylation status of SFRP2 gene for all samples. **Results** The abnormal methylation of SFRP2 gene was detected in 27 samples (27.3%) of AML patients; while none was detected in controls ($P < 0.001$). There was no significant associations between the methylation status of SFRP2 gene and age, gender, the clinical classification or the sample source (bone marrow/blood) of AML patients ($P > 0.05$). **Conclusions** The promoter methylation of SFRP2 gene plays an important role in the occurrence of AML. Promoter methylation status of SFRP2 gene in peripheral blood may serve as an useful biomarker for early diagnosis of AML.

【Key words】 Leukemia, myeloid, acute; Promoter regions (genetics); Methylation-specific PCR; SFRP2 gene

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.07.016

基金项目: 卫生部北京医院重点基金 (BJ-2008-76); 国家自然科学基金 (30972709; 81010052; 30801208)

作者单位: 100730 北京, 卫生部北京医院/卫生部北京老年医学研究所 卫生部老年医学重点实验室 (史晓红、孙亮、杨泽); 卫生部北京医院血液科 (常乃柏、范芸、宁尚勇); 卫生部北京医院 北京大学第五临床医学院 (周昌虎)

通讯作者: 杨泽, Email: yangze016@yahoo.com.cn

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一组常见的恶性血液肿瘤疾病,AML的遗传和临床表型比较复杂,具有明显的异质性。AML的发病机制至今不明。分泌型卷曲相关蛋白2(secreted frizzled-related protein 2, SFRP2)是近来发现的一种新的候选抑癌基因,近来研究显示,在多种人类的恶性肿瘤中,均存在SFRP2基因由于高甲基化而表达降低的现象的^[1-8]。

本研究采用甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR, MSP)技术,检测了AML患者和正常对照中SFRP2基因启动子区的甲基化状态,旨在探讨SFRP2基因的甲基化与AML发生的相关性;以及SFRP2基因的甲基化状况与AML的临床特征及样本来源(骨髓或外周血)的关系,以期为AML的早期诊断提供新的分子标记物。

材料与方 法

一、实验材料

1. 样本来源:AML患者样本采集自卫生部北京医院2007年9月至2010年10月门诊和住院患者,共99例,其中男65例,女34例,年龄8~81岁,17例采集了骨髓样本,82例采集了外周血样本。依据急性白血病FAB分型标准^[9]进行AML的诊断分型。正常对照样本取自卫生部北京医院内科门诊就诊的普通人群,共70例,其中男43例,女27例,年龄28~88岁,均采集外周血样本。所有研究对象均对该检测项目知情同意。

2. 主要试剂:全基因组DNA提取试剂盒购自Bio Chain公司;引物由上海生工生物技术有限公司合成;DNA marker(pUC18 DNA/Msp I)购自天根生化科技(北京)有限公司;DNA甲基化试剂盒(EZ DNA Methylation-Gold Kit),热启动的DNA聚合酶(ZymoTaqTM 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。

二、实验方法

1. 样本收集:EDTANa₂抗凝管收集AML患者的骨髓/外周血1 ml以及正常对照的外周血1 ml, -20℃冰箱保存。

2. 基因组DNA的提取:用全基因组DNA提取试剂盒抽提EDTANa₂抗凝的骨髓或外周血中的基因组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,所有样本的OD₂₆₀/OD₂₈₀的比值均在1.7~2.0之间,DNA样本置于-20℃保存备用。

3. 亚硫酸盐修饰:采用DNA甲基化试剂盒(EZ DNA Methylation-Gold Kit)对研究样本的基因组DNA进行亚硫酸盐修饰,同时进行甲基化和非甲基化阳性对照的亚硫酸盐修饰(甲基化的阳性对照选用纯化的人类HCT 116 DKO甲基化DNA;非甲基化的阳性对照选用纯化的人类HCT 116 DKO非甲基化DNA)。经测序验证,修饰后DNA序列中未甲基化的胞嘧啶全部转化为尿嘧啶。

4. MSP检测:用甲基化特异性引物和非甲基化特异性引物进行PCR扩增,引物详情见表1。PCR反应体系20 μl,其中2×Reaction Buffer 10 μl, dNTP Mix (0.25 mmol/L each) 0.2 μl, 10 μmol/L甲基化或非甲基化上下游引物各0.4 μl,修饰后的DNA模板20 ng, ZymoTaqTM DNA Polymerase (5 U/μl) 0.16 μl, 灭菌ddH₂O加至总体积20 μl。PCR反应条件为:95℃预变性10 min后进入主循环,94℃变性30 s,62℃(甲基化引物)或51℃(非甲基化引物)退火30 s,72℃延伸40 s,共40个循环,完成后72℃继续延伸10 min。每次PCR实验都设置阳性对照,阴性对照用灭菌ddH₂O取代处理后的DNA模板进行PCR。

三、统计学分析

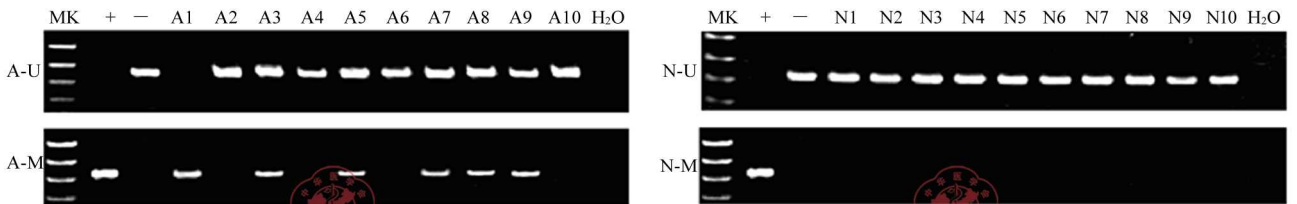
采用SPSS 11.5软件进行统计学分析,组间SFRP2基因启动子区甲基化发生频率比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 PCR的引物序列、退火温度及其产物长度

引物名称	引物序列(5'-3')	退火温度(℃)	产物长度(bp)
甲基化 SFRP2	上游 GGCTCGGAGTTTTTCGGAGTTGTGT	62	138
	下游 CCGCTCTCTTCGCTAAATACGACTCG		
非甲基化 SFRP2	上游 TTTTGGGTTGGAGTTTTTTGGAGTTGTGT	51	145
	下游 AACCCACTCTTCTACTAAATACAACACTCA		

结 果

1. AML患者和正常对照中SFRP2基因的甲基化情况:所有的研究样本均成功进行了MSP检测,MSP检测的产物电泳结果分析见图1。



A: AML患者; N: 正常对照; +: 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说明: 图中A1样本为完全甲基化; A3, A5, A7~9样本为不完全甲基化; 其他样本为非甲基化

图1 MSP检测样本SFRP2基因启动子区甲基化结果图

AML患者样本中共有27例样本检测到SFRP2基因启动子区的甲基化(其中3例为完全甲基化,24例为不完全甲基化),甲基化率为27.3%。70例正常对照中均未检测到SFRP2基因启动子区的甲基化。经 χ^2 检验,SFRP2的甲基化频率在AML患者组与正常对照组之间差异有统计学意义($\chi^2 = 22.721, P < 0.001$)。

2. SFRP2基因甲基化与AML患者临床特征的关系:SFRP2基因甲基化与AML患者临床特征的比较见表2。SFRP2基因的甲基化状态与AML患者的年龄、性别、临床分型及样本来源(骨髓/外周血)间均未发现显著关系($P > 0.05$)。

表2 SFRP2基因启动子区甲基化与AML患者临床特征之间的关系[例,(%)]

指标	例数	甲基化	非甲基化	χ^2 值	P 值	
年龄	≥ 60 岁	6(27.3)	16(72.7)	0.000	1.000	
	< 60 岁	77	21(27.3)			56(72.7)
性别	男	65	17(26.2)	0.119	0.730	
	女	34	10(29.4)			24(70.6)
临床分型	M1	3	1(33.3)	3.20	0.783	
	M2	37	11(29.7)			26(70.3)
	M3	24	4(16.7)			20(83.3)
	M4	8	1(12.5)			7(87.5)
	M5	18	5(27.8)			13(72.2)
	M6	2	1(50.0)			1(50.0)
	M7	1	0(0)			1(100)
	- ^a	6	4(66.7)			2(33.3)
组织	骨髓	17	7(41.2)	2.000	0.157	
	外周血	82	20(24.4)			62(75.6)

注:^a:AML确诊患者,但是临床分型情况缺失,共计6例

讨 论

AML 是一组常见的恶性血液肿瘤疾病,根据白血病细胞分化受阻的阶段不同以及细胞遗传学上的差异将 AML 分为了不同亚型,目前对其发病机制仍不清楚。近年来研究发现,一些肿瘤抑制基因和肿瘤相关基因的高甲基化与急性髓系白血病的发生、发展密切相关^[8,10-14]。

SFRPs 是一组 Wnt 信号通路的拮抗剂。SFRPs 均包含一个富含半胱氨酸的结构域(CRD),该结构域与 Wnt 信号受体卷曲蛋白有 30%~50% 的序列相似性。借助 CRD, SFRPs 可以通过与 Wnt 配体相互作用,以拮抗 Wnt 信号^[15]。由于 Wnt 信号通路在细胞的增殖、分化和凋亡中发挥着重要的作用, SFRPs 的表达降低,可能造成其对 Wnt 信号通路抑制作用的减弱,引起 Wnt 信号通路的异常活化,从而引发恶性肿瘤^[16-18]。近来在多种人类的恶性肿瘤中,均发现了 SFRP 家族的部分成员由于高甲基化而表达降低的现象^[1-8]。

SFRP2 是 SFRP 家族的成员之一, SFRP2 基因定位于人类染色体 4q31.3^[19], SFRP2 基因包含 3 个外显子和 2 个内含子,在其第 1 个外显子周围有着高密度的 CpG 岛。SFRP2 作为一种新的候选抑癌基因得到了广泛的关注。近来研究发现, SFRP2 基因启动子区域的高甲基化导致的基因沉默可能与包括大肠癌^[1]、结肠癌^[2]、宫颈腺癌^[3]、胰腺癌^[4]、口腔癌^[5]、子宫颈癌^[6]、间皮瘤^[7]、白血病等^[8]在内的多种恶性肿瘤的发生有关。

我们应用 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 SFRP2 基因启动子区的甲基化状态,结果显示, AML 患者样本组的甲基化率为 27.3%,正常对照样本组未检测到甲基化。统计学分析表明, SFRP2 的甲基化频率在 AML 患者组与正常对照组之间差异有统计学意义($P < 0.001$)。我们还进一步分析了 SFRP2 基因的甲基化状态与 AML 患者临床特征的关系,未发现 SFRP2 基因的甲基化状态与 AML 患者的年龄、性别和临床分型的关系($P > 0.05$)。

同时我们还分析了 AML 患者 SFRP2 基因的甲基化状态与样本来源(骨髓/外周血)的关系,并未发现显著关系($P > 0.05$)。一般认为,对于 AML 的甲基化检测应该取材于骨髓,而取材骨髓的创伤性就决定了其广泛应用于临床早期检测的不可行性。本研究结果表明, SFRP2 基因的甲基化可以从 AML 患者的外周血中检测到,并且外周血中的 SFRP2 基因的甲基化状态可以很好的代表 AML 患者骨髓中的 SFRP2 基因的甲基化状态。这使得血液中 SFRP2 基因的甲基化状态检测有可能成为一项方便、快捷的 AML 临床早期诊断指标。

综上所述, SFRP2 基因的甲基化与 AML 的发生显著相关。外周血中的 SFRP2 基因的甲基化检测有望成为一项新的 AML 早期发现,早期诊断的分子标记物推广用于临床检测。

参 考 文 献

- [1] Pehlivan S, Artac M, Sever T, et al. Gene methylation of SFRP2, P16, DAPK1, HIC1, and MGMT and KRAS mutations in sporadic colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010, 201:128-132.
- [2] Belshaw NJ, Elliott GO, Foxall RJ, et al. Profiling CpG island field methylation in both morphologically normal and neoplastic human colonic mucosa. *Br J Cancer*, 2008, 99:136-142.
- [3] Lin YW, Chung MT, Lai HC, et al. Methylation analysis of SFRP genes family in cervical adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135:1665-1674.
- [4] Bu XM, Zhao CH, Zhang N, et al. Hypermethylation and aberrant expression of secreted frizzled-related protein genes in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 2008, 14:3421-3424.
- [5] Pannone G, Bufo P, Santoro A, et al. WNT pathway in oral cancer: epigenetic inactivation of WNT-inhibitors. *Oncol Rep*, 2010, 24:1035-1041.
- [6] Chung MT, Sytwu HK, Yan MD, et al. Promoter methylation of SFRPs gene family in cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 2009, 112:301-306.
- [7] Kohno H, Amatya VJ, Takeshima Y, et al. Aberrant promoter methylation of WIF-1 and SFRP1, 2, 4 genes in mesothelioma. *Oncol Rep*, 2010, 24:423-431.
- [8] Valencia A, Román-Gómez J, Cervera J, et al. Wnt signaling pathway is epigenetically regulated by methylation of Wnt antagonists in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2009, 23:1658-1666.

- [9] 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, 33:451-458.
- [10] Hess CJ, Errami A, Berkhof J, et al. Concurrent methylation of promoters from tumor associated genes predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2008, 49:1132-1141.
- [11] 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, 83:439-448.
- [12] 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, 68:9538-9366.
- [13] Plass C, Oakes C, Blum W, et al. Epigenetics in acute myeloid leukemia. *Seminars in Oncology*, 2008, 35:378-387.
- [14] 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, 16:1247-1250.
- [15] Melkonyan HS, Chang WC, Shapiro JP, et al. SFRPs: a family of secreted apoptosis related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:13636-13641.
- [16] Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci*, 2006, 119:395-402.
- [17] Yamamoto H. Regulation of Wnt signaling pathway and its relationship with tumorigenesis. *Seikagaku*, 2008, 80:1079-1093.
- [18] Kikuchi A. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci*, 2003, 94:225-229.
- [19] Lee JL, Lin CT, Chueh LL, et al. Autocrine/paracrine secreted Frizzled-related protein 2 induces cellular resistance to apoptosis: a possible mechanism of mammary tumorigenesis. *J Biol Chem*, 2004, 279:14602-14609.

(收稿日期:2011-01-14)

(本文编辑:戚红丹)

史晓红, 常乃柏, 范芸, 等. 急性髓系白血病患者 SFRP2 基因甲基化的检测及临床意义 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5(7): 1962-1966.