

CTNNA1 基因启动子区异常甲基化与急性髓系白血病的相关性分析

刘 莉¹, 李绵洋^{2△} (1. 中国人民解放军第一六一医院检验科, 武汉 430010; 2. 中国人民解放军总医院临床检验科, 北京 100039)

【摘要】 目的 研究 CTNNA1 基因启动子区异常甲基化与急性髓系白血病(AML)发生的相关性。**方法** 选取 180 例 AML 患者骨髓标本及 24 例健康供者骨髓标本, 通过甲基化特异性 PCR 方法(MS-PCR)进行 CTNNA1 基因启动子区异常甲基化阳性率进行检测, 提取基因组 DNA, 设计硫化测序 PCR(BS-PCR)引物及甲基化特异性 PCR(MS-PCR)引物, 进行 PCR 扩增及测序分析。**结果** 5 例健康者标本及 5 例 AML 患者标本 DNA 经硫化且 BS-PCR 测序分析, 其健康者标本甲基化率分别为 1.5%、1.0%、1.0%、1.5%、1.0%, 而 AML 患者 CTNNA1 甲基化率分别为 92.0%、78.5%、86.0%、56.0%、90.0%, 远远高于健康供者。MS-PCR 分析结果显示, CTNNA1 基因在 24 例健康人中呈完全非甲基化状态, 在 180 例 AML 患者中其甲基化阳性率为 37.2% ($P < 0.05$)。**结论** CTNNA1 基因启动子区异常甲基化可能参与 AML 的发生, 为疾病的早期监测提供分子理论依据。

【关键词】 CTNNA1 基因; 异常甲基化; 急性髓系白血病

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.07.017 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)07-0907-02

Correlation between abnormal methylation of CTNNA1 gene promoter region with acute myeloid leukemia LIU Li¹, Li Mian-yang^{2△} (1. Department of Clinical Laboratory, 161 Hospital of PLA, Wuhan, Hubei 430010, China; 2. Department of Clinical Laboratory, General Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

【Abstract】 Objective To study the correlation between the aberrant methylation of CTNNA1 gene promoter region with acute myeloid leukemia(AML). **Methods** The bone marrow samples from 180 patients with AML and 24 healthy donors were collected in this study. The methylation-specific polymerase chain reaction (MS-PCR) method was adopted to detect the positive rate of aberrant methylation in CTNNA1 gene promoter region. The genome DNA was extracted, and the primers of sulfuration sequencing PCR(BS-PCR) and MS-PCR were designed to perform the PCR amplification and sequencing analysis. **Results** DNA in 5 healthy samples and 5 AML samples was vulcanized and sequenced by BS-PCR, the methylation rates in the healthy samples were 1.5%, 1.0%, 1.0%, 1.5% and 1.0% respectively, while the methylation rates of the CTNNA1 gene in AML patients were 92.0%, 78.5%, 86.0%, 56.0% and 90.0% respectively, which were much higher than the healthy donors. The MS-PCR analysis results showed that the CTNNA1 gene presented as the unmethylated status in healthy donors, the methylation rate in 180 AML patients was 37.2% ($P < 0.05$). **Conclusion** The aberrant methylation of the CTNNA1 gene promoter region is perhaps involved in the occurrence of AML, which provides the molecular theoretical basis of early monitoring disease.

【Key words】 CTNNA1 gene; aberrant methylation; acute myeloid leukemia

近几年研究表明, DNA 甲基化异常与肿瘤的发生关系密切, 其主要的致癌机制为抑癌基因启动子区被异常甲基化导致基因表达沉默进而导致肿瘤的发生^[1-2]; DNA 异常甲基化在急性髓系白血病(AML)中也普遍存在, 目前研究发现 P15、MDR1、ER、HIC1 等基因启动子区存在异常甲基化, 参与 AML 的发生, 并逐步作为分子标志为微小残留疾病(MRD)的及时监测提供理论依据, 同时为预后评估提供一定的理论指导意义^[3]。CTNNA1 基因编码 alpha-catenin 蛋白, 初步证据表明该基因是一个潜在的白血病干细胞肿瘤抑制基因, CTNNA1 基因异常甲基化存在与部分 MDS 及 AML 患者中^[4], 但是其异常甲基化的临床特点及细胞遗传学/分子生物学特点, 包括预后意义目前研究不明。本研究采用硫化测序 PCR 方法(BS-PCR)及甲基化特异性 PCR 方法(MS-PCR), 对健康者以及 AML 患者的骨髓标本进行对比分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择中国人民解放军第一六一医院门诊或住院患者 180 例 AML 骨髓标本以及 24 例健康供者骨髓标本。

1.2 仪器与试剂 运用 QIGEN 公司 DNA 提取试剂盒从骨髓标本中提取基因组 DNA, 紫外分光光度仪测 OD 值以确定其浓度与纯度。

1.3 方法 采用 DNA 硫化修饰试剂盒(QIGEN)对 1 μ g DNA 进行硫化修饰。BS-PCR 及 MS-PCR 引物设计均采用 Methyprimer(美国生物应用公司)软件, CTNNA1 基因 BS-PCR 引物(F: 5'-TAG TGT TTG GTT ATT TTG GAG G-3', R: 5'-ACC TCC TTA TTC TCC CTA CAA A-3'), 以及 MS-PCR 引物(甲基化引物 F: 5'-ACG CGT TGC GAG TTT TAT AC-3', 甲基化引物 R: 5'-TCG AAC GAA CGC TAC TAC AA-3'; 非甲基化引物 F: 5'-GGG ATG TGT TGT GAG TTT TAT AT-3', 非甲基化引物 R: 5'-TTC AAA CAA ACA CTA CTA CAA AT-3')由 Invitrogen 公司合成。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min, 95 $^{\circ}$ C 50 s, 59 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min 完成扩增。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 5 例健康者及 5 例初治 ANLL 患者骨髓标本, 硫化测序后其 CTNNA1 基因启动子区 -20~-800 bp 甲基化水平的差异结果显示, 5 例健康者的甲基化率分别为 1.5%、1.0%、1.0%、1.5%、1.0%, 而在 5 例初治 ANLL 患者中 CTNNA1 基因启动子区甲基化率分别为 92.0%、78.5%、86.0%、56.0%、90.0%, 远远高于健康者。

2.2 通过 MS-PCR 方法进行 24 例健康者 CTNNA1 基因启动子区甲基化状态检测, 结果显示 24 例健康者中 CTNNA1 基因启动子区未检测到异常甲基化。

2.3 180 例初治 ANLL 患者通过 MS-PCR 方法对 CTNNA1 基因启动子区甲基化状态进行检测, 结果显示 180 例 ANLL 患者中 67 例患者 CTNNA1 基因启动子区出现异常甲基化, 其甲基化率为 37.2%。

3 讨 论

近年来多数研究学者将目光投向甲基化谱的研究中, 不同的甲基化谱有不同的临床诊断意义。体外试验及基因敲除大鼠或转基因大鼠实验亦进一步证实特征性基因异常甲基化与造血肿瘤的发生存在一定的相关性^[1]。如 P15 基因异常甲基化, 在 30%~40% 的 MDS 患者, 以及 40%~45% 的 ANLL 中出现; DAPK 基因异常甲基化在 25%~30% 的 MDS 及近乎 100% 的 MM 中出现^[2]。因此检测特征性基因甲基化水平, 为临床靶向治疗提供理论依据。目前临床试验中, 应用甲基化转移酶抑制剂治疗一些 MDS 患者, t-AML 患者及一些 CML 急变期患者, 均取得了一定的效果。因此进一步印证了靶向治疗的重要性^[3]。诊断肿瘤中被逐一发现, 且某些基因异常甲基化存在一定的预后意义。而本文对健康者及 AML 患者骨髓标本进行 CTNNA1 基因启动子区甲基化水平分析, 发现部分 AML 患者 CTNNA1 基因启动子区出现异常甲基化, 而健康者骨髓中未发现 CTNNA1 基因异常甲基化现象。因此提示 CTNNA1 基因启动子区异常甲基化或许可以作为血液病的一项诊断与鉴别的分子标志。

目前研究发现, CTNNA1 基因在正常干细胞及其他血细胞中表达, 但是在部分 MDS 患者及 ANLL 患者中不表达或表达下调, 同时研究表明 CTNNA1 基因在部分 MDS 患者中出现异常甲基化, 且与 5 号染色体异常有很大的相关性^[4-5]; 同时研究发现 CTNNA1 基因启动子区异常甲基化, 通过影响造血细胞的时空性发育与分化从而参与血液病(包括 AML) 的发生^[6-9]。但目前未系统性研究 CTNNA1 基因在造血系统恶性肿瘤包括 AML 中的甲基化状态及表达水平。本研究选用硫化测序的方式对 CTNNA1 基因启动子区域进行甲基化水平检测, 发现在 5 例初治 ANLL 患者中, 其甲基化率远远高于健康者。

本研究进一步证实 CTNNA1 启动子区出现异常甲基化, 从而影响 CTNNA1 的表达, 进而影响造血分化。在今后的工作中将继续扩大临床标本进行 CTNNA1 基因启动子区甲基化状态检测, 并结合 CTNNA1 基因表达水平, 通过分析异常甲基化患者的临床特点、基因分型及其染色体核型等, 从而判断 CTNNA1 基因异常甲基化的临床诊断和预后意义。

目前对于造血系统恶性肿瘤的个体化治疗及靶向治疗提升到了一个新的高度, 对于 ANLL 的诊断, 也已经从早期的 FAB 分型, 到后来的 MICM 分型, 以及对于分子生物学的更进一步细化研究, 进而作为分子诊断的理论基础及分子靶向治疗和个体化治疗的理论依据^[10-12]。对于包括 CTNNA1 基因在内的诸多基因启动子区甲基化状态进行检测, 可以从表观遗传

学角度利用分子生物学手段为个体化治疗和靶向治疗提供理论基础。

参考文献

- [1] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation[J]. N Engl J Med, 2003, 349(21): 2042-2054.
- [2] Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, et al. Global DNA hypermethylation-associated cancer chemotherapy resistance and its reversion with the demethylating agent hydralazine[J]. J Transl Med, 2006, 4(8): 1-13.
- [3] Cui X, Wakai T, Shirai Y, et al. Arsenic trioxide inhibits DNA methyltransferase and restores methylation-silenced genes in human liver cancer cells[J]. Hum Pathol, 2006, 37(3): 298-311.
- [4] Liu TX, Becker MW, Jelinek J, et al. Chromosome 5q deletion and epigenetic suppression of the gene encoding alpha-catenin (CTNNA1) in myeloid cell transformation[J]. Nat Med, 2007, 13(1): 78-83.
- [5] Fu CT, Zhu KY, Mi JQ, et al. An evolutionarily conserved PTEN-C/EBPalpha-CTNNA1 axis controls myeloid development and transformation[J]. Blood, 2010, 115(23): 4715-4724.
- [6] Yuan H, Zhou J, Deng M, et al. Sumoylation of CCAAT/enhancer-binding protein α promotes the biased primitive hematopoiesis of zebrafish[J]. Blood, 2011, 117(26): 7014-7020.
- [7] Vanpoucke G, Nollet F, Tejpar S, et al. The human alpha-Ecatenin gene CTNNA1: mutational analysis and rare occurrence of a truncated splice variant. Biochim[J]. Biophys Acta, 2002, 12, 1574(3): 262-268.
- [8] Vasioukhin V, Bauer C, Degenstein L. Hyperproliferation and defects in epithelial polarity upon conditional ablation of alpha-catenin in skin[J]. Cell, 2001, 23, 104(4): 605-617.
- [9] Fairman J, Chumakov I, Chinault AC. Physical mapping of the minimal region of loss in 5q-chromosome. Proc[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(16): 7406-7410.
- [10] Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, et al. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies[J]. Blood, 2004, 103(5): 1635-1640.
- [11] Mund C, Hackanson B, Stresemann C, et al. Characterization of DNA demethylation effects induced by 5-Aza-2-deoxycytidine in patients with myelodysplastic syndrome[J]. Cancer Res, 2005, 65(16): 7086-7090.
- [12] Niitsu N, Hayashi Y, Sugita K, et al. Sensitization by 5-aza-2-deoxycytidine of leukaemia cells with MLL abnormalities to induction of differentiation by all-trans retinoic acid and 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3[J]. Br J Haematol, 2001, 112(2): 315-326.