

• 临床检验研究论著 •

儿童急性淋巴细胞白血病 p16 基因甲基化及表达水平临床意义

高 源,艾洪武,金敏荣,夏 维,代建红
(武汉市儿童医院检验科,湖北武汉 430016)

摘 要:目的 探讨 p16 基因甲基化及表达水平改变在儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)发病机制中的作用。方法 ALL 患儿 76 例,其中初发(uALL)患儿 69 例、复发(rALL)患儿 7 例,健康儿童 28 例纳入对照组。采用荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测外周血淋巴细胞 p16 基因 mRNA 表达;采用基于 SYBR Green 的甲基化特异性定量 PCR(MethySYBR PCR)检测 p16 基因启动子甲基化水平。结果 ALL 患儿淋巴细胞 p16 基因启动子甲基化水平高于健康儿童,uALL 患儿 p16 基因甲基化水平低于 rALL 患儿($P<0.05$);ALL 患儿 p16 基因 mRNA 水平低于健康儿童,uALL 患儿 p16 基因转录水平高于 rALL 患儿($P<0.05$);p16 基因转录水平与其启动子甲基化水平呈负相关关系($r=-0.63, P<0.05$);首次化疗即获缓解 ALL 患儿 p16 基因甲基化水平低于未完全缓解患儿,而 p16 mRNA 表达水平高于后者($P<0.05$);p16 基因低甲基化或高表达水平 ALL 患儿巩固强化治疗平均缓解时间明显低于 p16 基因高甲基化或低表达患儿($P<0.05$)。结论 p16 基因甲基化及表达低下可能与 ALL 发病有关,p16 基因甲基化状态及表达水平检测或可用于儿童 ALL 预后评估。

关键词: p16 基因; 白血病,淋巴样; 甲基化; 儿童

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.020

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)01-0046-03

Clinical significance of methylation status and expression level of p16 gene in childhood acute lymphoblastic leukemia

Gao Yuan, Ai Hongwu, Jin Minrong, Xia Wei, Dai Jianhong

(Department of Laboratory Medicine, Wuhan Children's Hospital, Wuhan, Hubei 430016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of methylation status and expression level of p16 gene on pathogenesis and prognosis of childhood acute lymphoblastic leukemia(ALL). **Methods** Seventy-six children with ALL and twenty-eight healthy children were enrolled and detected for expression level of p16 mRNA by real-time polymerase chain reaction(RT-PCR) and for the methylation status of CpG islands in promoter region of p16 gene by quantitative methylation-specific PCR based on SYBR Green(MethySYBR PCR) in peripheral blood mononuclear cells. **Results** CpG islands in p16 promoter were significantly methylated in children with ALL, while those in healthy volunteers were fully demethylated($P<0.05$). Methylation level of p16 gene in untreated patients was higher than that in recurrent patients($P<0.05$). Compared with healthy controls, transcriptional level of p16 gene in ALL patients decreased significantly($P<0.05$), while expression level of p16 mRNA in untreated patients was higher than that in recurrent patients($P<0.05$). Significant negative correlation between methylation level of p16 gene and its transcriptional level was observed in ALL patients($r=-0.63, P<0.05$). After first chemotherapy, methylation level of p16 promoter in patients with complete remission was lower than that in patients with incomplete remission, while expression level of p16 mRNA in patients with complete remission was higher than that in patients with incomplete remission($P<0.05$). During intensive consolidation chemotherapy, complete remission durations in patients with lower methylation levels or higher expression levels of p16 gene were lower than those with higher methylation levels or lower expression levels of p16 gene($P<0.05$). **Conclusion** Methylation and transcription levels of p16 gene could play a role in pathogenesis of childhood ALL and might be regarded as a prognostic index.

Key words: p16 gene; leukemia, lymphoid; methylation; child

急性淋巴细胞白血病(ALL)是一种恶性增殖的克隆性疾病,其细胞周期调控的分子机制尚未阐明^[1-3]。p16 抑癌基因参与多种肿瘤的发生、发展,其启动子区甲基化是致病的主要机制,并在部分血液淋巴-浆系统恶性疾病中发挥重要作用^[4-7]。本研究拟通过荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)技术,建立可同时快速检测 ALL 患儿淋巴细胞 p16 基因启动子区甲基化状态及表达水平的诊断技术,并探讨 p16 基因甲基化及表达水平在 ALL 发病机制中的作用及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 3 月至 2011 年 11 月于本院血液内科就诊的 ALL 患儿 76 例(ALL 组),男 41 例、女 35 例,初治患儿 69 例(uALL 组)、复发患儿 7 例(rALL 组),年龄 3.5~12.6 岁(中位年龄 7.3 岁),均经骨髓穿刺涂片、细胞化学染色及免疫组化染色确诊。于本院体检健康儿童 28 例纳入对照组,男 15 例、女 13 例,年龄 2.7~13.1(中位年龄 6.9)。ALL 组与对照

组年龄及性别无统计学差异($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 分离外周血单个核细胞(PBMC) 无菌采集乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)抗凝静脉血 5 mL,聚蔗糖(Ficoll)-泛影葡胺(密度 1.077)密度梯度离心法分离 PBMC,采用锥虫蓝染色判定细胞活力大于 95%。

1.2.2 基于 SYBR Green 的甲基化特异性定量 PCR(MethySYBR PCR) (1)基因组 DNA 提取:取 PBMC 标本,按试剂盒(德国 QIAGEN)说明书提取基因组 DNA,紫外分光光度计测定 DNA 含量。(2)亚硫酸氢盐修饰:取 1 μg 基因组 DNA,按试剂盒(美国 Zymo)说明书分别进行 C-T 转换,产物经二次脱盐、纯化后回收、重悬于 10 μL TE 溶液、-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。(3)引物合成:参照文献[8],由广州英骏生物技术有限公司合成甲基化和非甲基化特异性引物,引物序列见表 1。(4)MethySYBR PCR 扩增:以处理后的基因组 DNA 为模板,

采用甲基化特异性和非甲基化特异性引物进行 PCR 扩增 35~40 循环,具体参数见表 1。(5)MSP 产物鉴定:取 MSP 产物 10 μ L 在 2%琼脂糖凝胶中以 90 V 电泳 30 min,确定产物长度;产物经回收、纯化后,送广州英骏生物技术有限公司测序。测

序结果与目的片段序列完全一致。(6)甲基化定量:参照 Lo 等^[9]的报道,以处理后的基因组 DNA 为模板,以甲基化特异性引物和非甲基化特异性引物同时进行 RT-PCR 检测。

表 1 RT-PCR 及 MSP 引物序列

引物名称	引物序列	退火温度(℃)	产物长度(bp)
p16	正向引物:5'-GAA GAA AGA GGA GGG GTT GG-3' 反向引物:5'-TGA CGC TGA GCG TGA AGA AG-3'	56	111
β -Actin	正向引物:5'-GAG CTA CGA GCT GCC TGA CG-3' 反向引物:5'-GTA GTT TCG TGG ATG CCA CAG-3'	56~58	120
p16_U	正向引物:5'-TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT-3' 反向引物:5'-CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A-3'	56	151
p16_M	正向引物:5'-TTA TTA GAG GGT GCG GAT CGC-3' 反向引物:5'-GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA-3'	56	150

1.2.3 RT-PCR 检测 (1)总 RNA 提取与定量:取 PBMC 标本,按试剂盒(美国 Gentra)说明书提取总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 含量及纯度。(2)RT-PCR 扩增:按试剂盒(立陶宛 MBI)说明书逆转录合成 cDNA,参照 Genebank 中目的基因 mRNA 序列设计引物(序列见表 1),由广州英骏生物技术有限公司合成;取 1 μ L cDNA 为模板,进行 PCR 扩增 30~40 循环。(3)RT-PCR 产物鉴定:取 p16 及 β -actin 扩增产物 10 μ L 在 2%琼脂糖凝胶中以 90 V 电泳 30 min,回收、纯化后送广州英骏生物技术有限公司测序。测序结果与 Genebank 中目的基因 mRNA 序列完全一致。(4)RT-PCR 检测:采用 SYBR Green 试剂盒(德国 QIAGEN),使用罗氏 LightCycler RT-PCR 扩增仪进行检测,应用 Relative Quantification Software Ver 1.0 软件进行结果分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计学软件进行数据分析。计量资料 $\bar{x} \pm s$ 表示,经方差齐性检验后,采用 *t* 检验比较两组间差异,相关分析采用 Pearson 相关性分析;显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 p16 基因甲基化检测结果 MethySYBR PCR 检测显示,ALL 患儿 PBMC p16 基因启动子区 CpG 岛呈高甲基化水平,而健康儿童呈去甲基化状态($P<0.05$),且 uALL 组 p16 基因甲基化水平明显低于 rALL 组($P<0.05$)。结果图 1 见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”。

2.2 p16 基因表达水平 ALL 患儿 p16 基因 mRNA 水平明显降低,且初治患儿 mRNA 水平明显高于复发患儿($P<0.05$);p16 基因转录水平与其启动子甲基化水平呈负相关关系($r=-0.63, P<0.05$)。结果图 2 见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”。

2.3 预后分析 随访观察显示,首次化疗即获完全缓解的 uALL 患儿(47/69)化疗前 p16 基因甲基化水平低于未完全缓解患儿[(35.81 $\pm$ 8.35)% vs (65.29 $\pm$ 17.52)%, $P<0.05$],而 p16 mRNA 水平高于未缓解患儿[(5.11 $\pm$ 1.92) $\times 10^{-1}$ vs (2.05 $\pm$ 0.61) $\times 10^{-1}, P<0.05$]。根据其甲基化或表达水平中位数进行分组,p16 基因低甲基化或高表达 ALL 患儿在巩固强化治疗中的平均缓解时间(CRD)分别为 16、13 周,而 p16 基因高甲基化或低表达 ALL 患儿则分别为 52、46 周,*t* 检验显示具有统计学差异($P<0.05$)。

3 讨 论

肿瘤是一个多因素、多阶段、多基因变化所致的体细胞获得性遗传缺陷病,其本质是细胞周期调节失控,细胞呈自主、无限制性增殖。有核细胞的增殖分化依赖于细胞有序的周期活

动。细胞周期素依赖激酶(CDKs)的时相性激活是细胞周期调控机制的核心。p16 基因是定位于 9p21 的多种肿瘤抑制基因(MTS1),其产物 P16 蛋白则是 CDKs 抑制剂家族的一员,在细胞增殖周期调控中发挥重要作用^[10]。CpG 岛甲基化可使 p16 基因 mRNA 表达下调或缺失,因而甲基化被认为是导致 p16 基因失活的原因之一^[11-12]。Esteller 等^[13]研究认为,p16 基因启动子区 CpG 岛甲基化是前列腺癌、膀胱癌、大肠癌、乳腺癌、肾细胞癌和胃癌等多种肿瘤 p16 基因失活的主要机制。Baur 等^[14]对几种淋巴瘤的研究表明,纯合性缺失和突变都不是淋巴瘤形成过程中基因失活的相关因素,其主要机制是 p16 和 p15 基因启动子区甲基化。已有研究证实 ALL 患者 p16 基因表达缺失率明显升高^[15],推测 ALL 的发生、发展可能与 p16 基因甲基化改变有关。

ALL 患者 p16 基因甲基化率明显升高,但多见于成人 ALL 患者,儿童 ALL 与 p16 基因的相关性研究较为少见^[16]。且前述研究多采用甲基化敏感的限制性内切酶及 PCR 技术,仅为定性分析。本研究首次采用 MethySYBR PCR 技术,对 ALL 患儿 p16 基因启动子 CpG 岛甲基化水平进行量化评估,结果显示 ALL 患儿 p16 基因甲基化水平明显升高,而健康儿童基本处于去甲基化状态。进一步比较 p16 基因甲基化水平在 uALL 及 rALL 患儿间的差异,发现 rALL 患儿 p16 基因甲基化水平明显高于 uALL 患儿,间接提示 p16 基因甲基化水平升高可能参与儿童 ALL 的发生机制。为进一步验证 p16 基因 CpG 岛甲基化改变与儿童 ALL 的关系,本研究采用 RT-PCR 技术检测 p16 基因表达水平,结果显示 ALL 患儿 p16 基因表达水平明显降低,且 rALL 患儿 p16 基因表达水平明显低于 uALL 患儿。相关分析亦表明 ALL 患儿 p16 基因表达水平与其甲基化水平呈负相关关系,进一步说明 p16 基因甲基化可能是导致儿童 ALL 的始发原因之一。

随访观察显示,首次化疗即获完全缓解的患儿 p16 基因甲基化水平明显低于其他患儿,而其 p16 基因表达水平则明显升高,推测 p16 基因甲基化水平可能与儿童 ALL 预后存在一定关系。为证实上述假设,对所有 uALL 患儿进行长期随访,发现 p16 基因低甲基化或高表达水平患儿在巩固强化治疗中的平均缓解时间明显小于 p16 基因高甲基化或低表达患儿,提示 p16 基因甲基化及表达水平或可作为 ALL 患儿化疗预后的评估指标之一。

综上所述,p16 基因启动子 CpG 甲基化可使其表达降低或缺失,可能是儿童 ALL 发病的主要始发因素之一。同时,p16 基因甲基化及表达水平在儿童 ALL 化疗中具有一定的预后作用。采用 RT-PCR 技术可在单一条件下同时对 p16 基因

甲基化及表达水平进量化评估,具备快速、简便、灵敏度高等优势,可用于指导 ALL 个体化治疗,在临床上具有较为广泛的应用前景。

参考文献

- [1] Pui CH. Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. J Formos Med Assoc, 2010, 109(11): 777-787.
- [2] Landman-Parker J, Pagès P, Petit A, et al. New insights into acute lymphoblastic leukemia[J]. Bull Acad Natl Med, 2009, 193(7): 1501-1507.
- [3] Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2009, 23(4): 655-674.
- [4] Ekmekci CG, Gutiérrez MI, Siraj AK, et al. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in acute myeloid leukemia[J]. Am J Hematol, 2004, 77(3): 233-240.
- [5] Herman JG, Civin CI, Issa JP, et al. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies[J]. Cancer Res, 1997, 57(5): 837-841.
- [6] Hsiao PC, Liu MC, Chen LM, et al. Promoter methylation of p16 and EDNRB gene in leukemia patients in Taiwan[J]. Chin J Physiol, 2008, 51(1): 27-31.
- [7] 邱吉庆, 谭岩, 赵刚, 等. 人脑胶质瘤组织 p16INK4 蛋白的表达及其基因突变 SSCP 分析[J]. 吉林大学学报医学版, 2003, 29(3): 273-276.
- [8] Csepregi A, Ebert MP, Röcken C, et al. Promoter methylation of CDKN2A and lack of p16 expression characterize patients with hepatocellular carcinoma[J]. BMC Cancer, 2010-06-22 [2012-11-12], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2927998/>.
- [9] Lo PK, Watanabe H, Cheng PC, et al. MethySYBR, a novel quantitative PCR assay for the dual analysis of DNA methylation and CpG methylation density[J]. J Mol Diagn, 2009, 11(5): 400-414.
- [10] Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types[J]. Science, 1994, 264(5157): 436-440.
- [11] Reed AL, Califano J, Cairns P, et al. High frequency of p16(CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 1996, 56(16): 3630-3633.
- [12] Herman JG, Merlo A, Mao L, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers[J]. Cancer Res, 1995, 55(20): 4525-4530.
- [13] Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours[J]. J Pathol, 2002, 196(1): 1-7.
- [14] Baur AS, Shaw P, Burri N, et al. Frequent methylation silencing of p15(INK4b)(MTS2) and p16(INK4a)(MTS1) in B-cell and T-cell lymphomas[J]. Blood, 1999, 94(5): 1773-1781.
- [15] Omura-Minamisawa M, Diccianni MB, Batova A, et al. Universal inactivation of both p16 and p15 but not downstream components is an essential event in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(4): 1219-1228.
- [16] 范丽萍, 沈建箴, 叶宝国, 等. 巢式 MSP 法检测急性白血病患者 p16 基因甲基化状态[J]. 中国实验血液学杂志, 2007, 15(2): 258-261.
- [12] Demichelis F, Fall K, Perner S, et al. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort[J]. Oncogene, 2007, 26(31): 4596-4599.
- [13] Lapointe J, Kim YH, Miller MA, et al. A variant TMPRSS2 isoform and ERG fusion product in prostate cancer with implications for molecular diagnosis[J]. Mod Pathol, 2007, 20(4): 467-473.
- [14] Attard G, Clark J, Ambrosini L, et al. Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(3): 253-263.
- [15] Gopalan A, Leversha MA, Satagopan JM, et al. TMPRSS2:ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy[J]. Cancer Res, 2009, 69(4): 1400-1406.
- [16] Cheng L, Song SY, Pretlow TG, et al. Evidence of independent origin of multiple tumors from patients with prostate cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 1998, 90(3): 233-237.
- [17] Guo CC, Zuo G, Cao D, et al. Prostate cancer of transition zone origin lacks TMPRSS2:ERG gene fusion[J]. Mod Pathol, 2009, 22(7): 866-871.
- [18] Clark JP, Cooper CS. ETS gene fusions in prostate cancer[J]. Nat Rev Urol, 2009, 6(8): 429-439.
- [19] Liu W, Laitinen S, Khan S, et al. Copy number analysis indicates monoclonal origin of lethal metastatic prostate cancer[J]. Nat Med, 2009, 15(5): 559-565.
- [20] Van Der Kwast TH, Amin MB, Billis A, et al. International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Handling and Staging of Radical Prostatectomy Specimens. Working group 2: T2 substaging and prostate cancer volume[J]. Mod Pathol, 2011, 24(1): 16-25.

(收稿日期: 2012-09-08)

(收稿日期: 2012-10-08)